

Aus dem Hygiene Institut der
Johannes Gutenberg Universität Mainz

Zur Frage der Übertragung von Viren durch Lebensmittel:

VERGLEICH VON DREI VERFAHREN ZUR
ANREICHERUNG VON
VIREN DURCH LEBENSMITTEL

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin
der Johannes Gutenberg Universität
in Mainz
dem Fachgebiet Medizin vorgelegt von

GERHARD WAGNER
aus Andernach

Mainz 1979

Aus dem Hygiene Institut der
Johannes Gutenberg Universität Mainz

Zur Frage der Übertragung von Viren durch Lebensmittel:

VERGLEICH VON DREI VERFAHREN ZUR
ANREICHERUNG VON
VIREN DURCH LEBENSMITTEL

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin
der Johannes Gutenberg Universität
in Mainz
dem Fachgebiet Medizin vorgelegt von

GERHARD WAGNER

aus Andernach

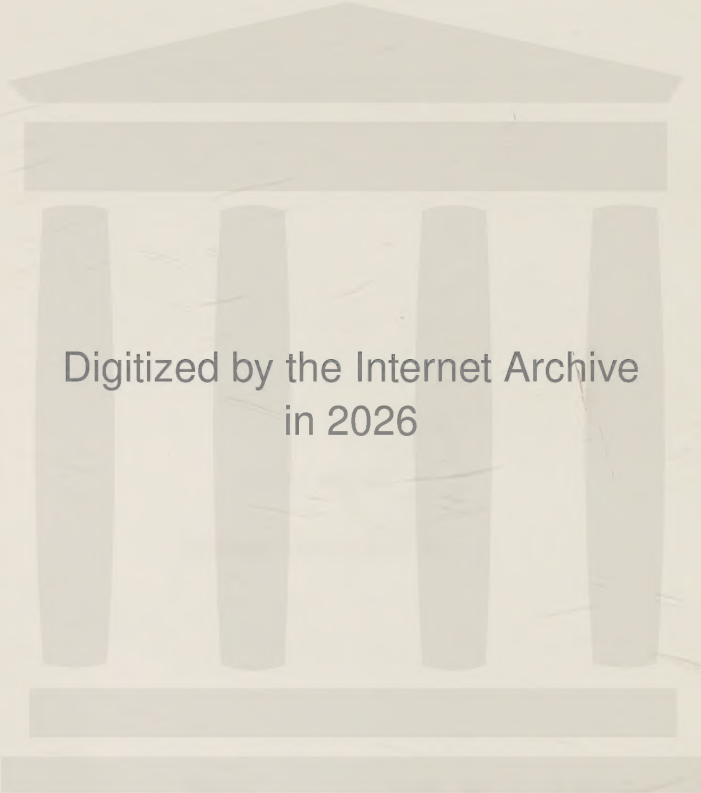
Mainz 1979



Dekan: Prof. Dr. E. Leithoff
1. Gutachter: Prof. Dr. E. Pfeiffer
2. Gutachter: Prof. Dr. J. Borneff

Tag der mündlichen Prüfung: 24.10.1979

1	Introduction	1
2	General Information about the Project	2
3	Methodology	3
4	Results	4
5	Discussion	5
6	Conclusion	6
7	References	7
8	Appendix	8
9	Bibliography	9
10	Index	10
11	Glossary	11
12	Summary	12
13	Abstract	13
14	Introduction	14
15	Methodology	15
16	Results	16
17	Discussion	17
18	Conclusion	18
19	References	19
20	Appendix	20
21	Bibliography	21
22	Index	22
23	Glossary	23
24	Summary	24
25	Abstract	25
26	Introduction	26
27	Methodology	27
28	Results	28
29	Discussion	29
30	Conclusion	30
31	References	31
32	Appendix	32
33	Bibliography	33
34	Index	34
35	Glossary	35
36	Summary	36
37	Abstract	37
38	Introduction	38
39	Methodology	39
40	Results	40
41	Discussion	41
42	Conclusion	42
43	References	43
44	Appendix	44
45	Bibliography	45
46	Index	46
47	Glossary	47
48	Summary	48
49	Abstract	49
50	Introduction	50
51	Methodology	51
52	Results	52
53	Discussion	53
54	Conclusion	54
55	References	55
56	Appendix	56
57	Bibliography	57
58	Index	58
59	Glossary	59
60	Summary	60
61	Abstract	61
62	Introduction	62
63	Methodology	63
64	Results	64
65	Discussion	65
66	Conclusion	66
67	References	67
68	Appendix	68
69	Bibliography	69
70	Index	70
71	Glossary	71
72	Summary	72
73	Abstract	73
74	Introduction	74
75	Methodology	75
76	Results	76
77	Discussion	77
78	Conclusion	78
79	References	79
80	Appendix	80
81	Bibliography	81
82	Index	82
83	Glossary	83
84	Summary	84
85	Abstract	85
86	Introduction	86
87	Methodology	87
88	Results	88
89	Discussion	89
90	Conclusion	90
91	References	91
92	Appendix	92
93	Bibliography	93
94	Index	94
95	Glossary	95
96	Summary	96
97	Abstract	97
98	Introduction	98
99	Methodology	99
100	Results	100
101	Discussion	101
102	Conclusion	102
103	References	103
104	Appendix	104
105	Bibliography	105
106	Index	106
107	Glossary	107
108	Summary	108
109	Abstract	109
110	Introduction	110
111	Methodology	111
112	Results	112
113	Discussion	113
114	Conclusion	114
115	References	115
116	Appendix	116
117	Bibliography	117
118	Index	118
119	Glossary	119
120	Summary	120
121	Abstract	121
122	Introduction	122
123	Methodology	123
124	Results	124
125	Discussion	125
126	Conclusion	126
127	References	127
128	Appendix	128
129	Bibliography	129
130	Index	130
131	Glossary	131
132	Summary	132
133	Abstract	133
134	Introduction	134
135	Methodology	135
136	Results	136
137	Discussion	137
138	Conclusion	138
139	References	139
140	Appendix	140
141	Bibliography	141
142	Index	142
143	Glossary	143
144	Summary	144
145	Abstract	145
146	Introduction	146
147	Methodology	147
148	Results	148
149	Discussion	149
150	Conclusion	150
151	References	151
152	Appendix	152
153	Bibliography	153
154	Index	154
155	Glossary	155
156	Summary	156
157	Abstract	157
158	Introduction	158
159	Methodology	159
160	Results	160
161	Discussion	161
162	Conclusion	162
163	References	163
164	Appendix	164
165	Bibliography	165
166	Index	166
167	Glossary	167
168	Summary	168
169	Abstract	169
170	Introduction	170
171	Methodology	171
172	Results	172
173	Discussion	173
174	Conclusion	174
175	References	175
176	Appendix	176
177	Bibliography	177
178	Index	178
179	Glossary	179
180	Summary	180
181	Abstract	181
182	Introduction	182
183	Methodology	183
184	Results	184
185	Discussion	185
186	Conclusion	186
187	References	187
188	Appendix	188
189	Bibliography	189
190	Index	190
191	Glossary	191
192	Summary	192
193	Abstract	193
194	Introduction	194
195	Methodology	195
196	Results	196
197	Discussion	197
198	Conclusion	198
199	References	199
200	Appendix	200
201	Bibliography	201
202	Index	202
203	Glossary	203
204	Summary	204
205	Abstract	205
206	Introduction	206
207	Methodology	207
208	Results	208
209	Discussion	209
210	Conclusion	210
211	References	211
212	Appendix	212
213	Bibliography	213
214	Index	214
215	Glossary	215
216	Summary	216
217	Abstract	217
218	Introduction	218
219	Methodology	219
220	Results	220
221	Discussion	221
222	Conclusion	222
223	References	223
224	Appendix	224
225	Bibliography	225
226	Index	226
227	Glossary	227
228	Summary	228
229	Abstract	229
230	Introduction	230
231	Methodology	231
232	Results	232
233	Discussion	233
234	Conclusion	234
235	References	235
236	Appendix	236
237	Bibliography	237
238	Index	238
239	Glossary	239
240	Summary	240
241	Abstract	241
242	Introduction	242
243	Methodology	243
244	Results	244
245	Discussion	245
246	Conclusion	246
247	References	247
248	Appendix	248
249	Bibliography	249
250	Index	250
251	Glossary	251
252	Summary	252
253	Abstract	253
254	Introduction	254
255	Methodology	255
256	Results	256
257	Discussion	257
258	Conclusion	258
259	References	259
260	Appendix	260
261	Bibliography	261
262	Index	262
263	Glossary	263
264	Summary	264
265	Abstract	265
266	Introduction	266
267	Methodology	267
268	Results	268
269	Discussion	269
270	Conclusion	270
271	References	271
272	Appendix	272
273	Bibliography	273
274	Index	274
275	Glossary	275
276	Summary	276
277	Abstract	277
278	Introduction	278
279	Methodology	279
280	Results	280
281	Discussion	281
282	Conclusion	282
283	References	283
284	Appendix	284
285	Bibliography	285
286	Index	286
287	Glossary	287
288	Summary	288
289	Abstract	289
290	Introduction	290
291	Methodology	291
292	Results	292
293	Discussion	293
294	Conclusion	294
295	References	295
296	Appendix	296
297	Bibliography	297
298	Index	298
299	Glossary	299
300	Summary	300
301	Abstract	301
302	Introduction	302
303	Methodology	303
304	Results	304
305	Discussion	305
306	Conclusion	306
307	References	307
308	Appendix	308
309	Bibliography	309
310	Index	310
311	Glossary	311
312	Summary	312
313	Abstract	313
314	Introduction	314
315	Methodology	315
316	Results	316
317	Discussion	317
318	Conclusion	318
319	References	319
320	Appendix	320
321	Bibliography	321
322	Index	322
323	Glossary	323
324	Summary	324
325	Abstract	325
326	Introduction	326
327	Methodology	327
328	Results	328
329	Discussion	329
330	Conclusion	330
331	References	331
332	Appendix	332
333	Bibliography	333
334	Index	334
335	Glossary	335
336	Summary	336
337	Abstract	337
338	Introduction	338
339	Methodology	339
340	Results	340
341	Discussion	341
342	Conclusion	342
343	References	343
344	Appendix	344
345	Bibliography	345
346	Index	346
347	Glossary	347
348	Summary	348
349	Abstract	349
350	Introduction	350
351	Methodology	351
352	Results	352
353	Discussion	353
354	Conclusion	354
355	References	355
356	Appendix	356
357	Bibliography	357
358	Index	358
359	Glossary	359
360	Summary	360
361	Abstract	361
362	Introduction	362
363	Methodology	363
364	Results	364
365	Discussion	365
366	Conclusion	366
367	References	367
368	Appendix	368
369	Bibliography	369
370	Index	370
371	Glossary	371
372	Summary	372
373	Abstract	373
374	Introduction	374
375	Methodology	375
376	Results	376
377	Discussion	377
378	Conclusion	378
379	References	379
380	Appendix	380
381	Bibliography	381
382	Index	382
383	Glossary	383
384	Summary	384
385	Abstract	385
386	Introduction	386
387	Methodology	387
388	Results	388
389	Discussion	389
390	Conclusion	390
391	References	391
392	Appendix	392
393	Bibliography	393
394	Index	394
395	Glossary	395
396	Summary	396
397	Abstract	397
398	Introduction	398
399	Methodology	399
400	Results	400
401	Discussion	401
402	Conclusion	402
403	References	403
404	Appendix	404
405	Bibliography	405
406	Index	406
407	Glossary	407
408	Summary	408
409	Abstract	409
410	Introduction	410
411	Methodology	411
412	Results	412
413	Discussion	413
414	Conclusion	414
415	References	415
416	Appendix	416
417	Bibliography	417
418	Index	418
419	Glossary	419
420	Summary	420
421	Abstract	421
422	Introduction	422
423	Methodology	423
424	Results	424
425	Discussion	425
426	Conclusion	426
427	References	427
428	Appendix	428
429	Bibliography	429
430	Index	430
431	Glossary	431
432	Summary	432
433	Abstract	433
434	Introduction	434
435	Methodology	435
436	Results	436
437	Discussion	437
438	Conclusion	438
439	References	439
440	Appendix	440
441	Bibliography	441
442	Index	442
443	Glossary	443
444	Summary	444
445	Abstract	445
446	Introduction	446
447	Methodology	447
448	Results	448
449	Discussion	449
450	Conclusion	450
451	References	451
452	Appendix	452
453	Bibliography	453
454	Index	454
455	Glossary	455
456	Summary	456
457	Abstract	457
458	Introduction	458
459	Methodology	459
460	Results	460
461	Discussion	461
462	Conclusion	462
463	References	463
464	Appendix	464
465	Bibliography	465
466	Index	466
467	Glossary	467
468	Summary	468
469	Abstract	469
470	Introduction	470
471	Methodology	471
472	Results	472
473	Discussion	473
474	Conclusion	474
475	References	



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis

Seite

1.	Einleitung	1
2.	Durch Lebensmittel bedingte Virusepidemien	3
2.1	Hepatitisviren	3
2.2	Enteroviren	6
2.3	Andere Viren	8
3.	Bisherige Untersuchungen zum Überleben von Viren in Lebensmitteln	9
4.	Bisherige Versuche zur Anreicherung von Viren aus Lebensmitteln	12
5.	Eigene Untersuchungen	15
5.1	Einführung und Problemstellung	15
5.2	Material und Methodik	17
5.3	Aufbereitung der Lebensmittel vor der Virusanreicherung	18
5.4	Virusanreicherung	21
5.4.1	Alginatfiltration	21
5.4.2	2-Phasen-System	21
5.4.3	FeCl ₃ -Flockung kombiniert mit dem 2-Phasen-System	22
6.	Ergebnisse	24
6.1	Vorversuche	24
6.2	Hauptversuche	31
6.2.1	Experimente mit dem 2-Phasen-System	31
6.2.2	Experimente mit der Alginatfiltration	40
6.2.3	Experimente mit der FeCl ₃ -Flockung kombiniert mit dem 2-Phasen-System	49
6.3	Zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse	57
7.	Diskussion	61
8.	Zusammenfassung	69
9.	Literatur	71

1. Einleitung

Lebensmittel als bedeutsame Überträger viraler Erkrankungen haben bis heute wenig Beachtung gefunden, da vielfach angenommen wurde, daß Viruserkrankungen des Menschen durch infizierte Lebensmittel nur sehr selten vorkommen. Denn Viren können sich im Gegensatz zu Bakterien in Nahrungsmitteln nicht vermehren und würden relativ rasch absterben. Dieser Vorstellung widersprechen die Befunde von PLOTKIN und KATZ (79) bzw. WESTWOOD und SATTER (97), die aufzeigen, daß die orale Aufnahme schon geringster Virusmengen von 1 - 10 TCID₅₀ beim Menschen zu einer Infektion führt. Hinsichtlich der Überlebensfähigkeit weisen weitere Versuche mit verschiedenen Viren in Wasser und Lebensmitteln darauf hin, daß diese durchaus über einen längeren Zeitraum in Nahrungsmitteln persistieren können. Zusätzlich ist beachtenswert, daß in neuerer Zeit bei explosionsartigen Ausbrüchen von Poliomyelitis- oder Hepatitis-Epidemien Lebensmittel als offensichtliche Virusvektoren fungierten.

In einigen Fällen waren die Lebensmittelprodukte primär kontaminiert; vor allem aber erfuhren die Lebensmittel eine sekundäre Verunreinigung. Dabei wurden neben der Verwendung von verunreinigtem Wasser Fahrlässigkeit des Personals bei der Lebensmittelherstellung beschuldigt. Als wichtigste Virusüberträger wurden Molkereiprodukte, Fleisch, Fisch und andere Meerestierprodukte beschrieben. Neben der Gefährdung des Menschen durch spezifische bekannte Viruserkrankungen weist MAYR (64) noch auf eine große Zahl weiterer noch gefährlicherer Schadgruppen wie viral bedingte, langsam sich entwickelnde chronische Krankheiten, persistierende Infektionen, neue infektiöse Pathogene (Viroide) und auf die Onkogenität hin.

Unser Ziel war es daher, zunächst darzustellen, welche Rolle Lebensmittel hinsichtlich der Virusübertragung bei Epidemien spielten. Im experimentellen Teil wurden dann Versuche zur Anreicherung von Viren aus infizierten Nahrungsmitteln durchgeführt.

2. Durch Lebensmittel bedingte Virusepidemien.

2.1 Hepatitisviren.

Obwohl es bisher noch nicht gelungen ist Hepatitisviren zu züchten, weist MURPHY (75) aufgrund seiner Experimente darauf hin, daß die infektiöse Hepatitis durch Nahrungsmittel übertragen werden kann.

Dem Nachweis aber, daß Lebensmittel Hepatitisvektoren darstellen, stehen erhebliche Schwierigkeiten entgegen, da in den meisten Fällen die Infektionsquellen nicht bestimmbar sind (36). Neben der langen Inkubationszeit und den vielen inapparenten Krankheitsverläufen erschwert die Nichtanzüchtbarkeit der Erreger erheblich die epidemiologische Untersuchung.

So berichtet MURPHY (75) von 10 Hepatitiserkrankungen in 8 Familien innerhalb von 4 Wochen, als deren gemeinsame Infektionsquelle Milch in Frage kam. Alle Erkrankten verwendeten Trinkmilch von einer Farm, in der jegliche hygienischen Einrichtungen zum Milchverkauf fehlten. Die in einem offenen Behälter zum Verkauf bestimmte Milch war von zwei an Hepatitis erkrankten Nachbarn kontaminiert worden. Als weiterer Übertragungsweg kam ein Brunnen in Frage, mit dessen Wasser die Milcheimer gereinigt wurden. Dieser Brunnen befand sich in unmittelbarer Nähe eines "Fallklosetts", das von zwei Erkrankten benutzt wurde.

KIRK (43) brachte eine Übertragung der Hepatitis durch Lebensmittel mit dem Auftreten vieler Fliegen in Verbindung. In dem beschriebenen Fall wurde die Hepatitis

wiederum durch Milch ausgelöst; dabei war die Milch offensichtlich durch Fliegen, die Zugang zu Toilettenanlagen hatten, kontaminiert.

EISENSTEIN (25) berichtet von 24 Hepatitiserkrankungen in einem Krankenhaus, bei denen Orangensaft als Virus-carrier fungierte. Die epidemiologischen Untersuchungen ergaben, daß eine Küchenangestellte, die den Orangensaft zubereitete, eine klinisch inapparente Hepatitis durchgemacht hatte. Die Infektionskette Küchenangestellte - Orangensaft - Patienten schien hier gesichert, zumal die infektiöse Hepatitis auch bei inapparenten Erkrankungen übertragen werden kann (32, 51).

ROOS (83) beschrieb 1956 erstmals eine Hepatitisepidemie in Schweden als Folge des Genusses roher Schalentiere. 1961 wurden ebenfalls 80 Hepatitiserkrankungen auf den Genuß von Austern zurückgeführt. 1962 setzte man eine Epidemie von 459 Fällen in New Jersey in Beziehung zum Genuß roher Muscheln (24).

Weiter berichtet SHAUN (86) von 123 Hepatitisfällen im Zusammenhang mit dem Verzehr von Muscheln, die verbotenerweise in Abwasser belasteten Gewässern geerntet worden waren. Begünstigend für das Persistieren der Hepatitisviren dürfte die niedrige Wassertemperatur während der Winterzeit gewesen sein, was METCALF (67) anhand seiner Versuche zeigen konnte. In der Folgezeit mehrten sich Berichte verschiedener Autoren (14, 44, 71, 72, 82), nach denen Hepatitiserkrankungen nach dem Verzehr roher Muscheln auftraten.

KOFF (46) sieht nicht nur im Verzehr von Muscheln sondern von Schalentieren allgemein eine bedeutende Quelle für die infektiöse Hepatitis; denn es wurden weitere Hepatitisepidemien in Verbindung mit Meeresfrüchten gebracht (24, 63, 76).

Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, daß oft das gehäufte Auftreten von Hepatitiden mit vorausgegangenen Gastroenteritiden verbunden ist, was auch von DISMUKES (23) beschrieben wird.

Neben Milch (75), Orangensaft (25) und Schalentieren (24, 63, 86) kommt ebenfalls Wasser als Hepatitisvektor in Frage (73, 74, 93). Eine Übersicht der Hepatitisübertragung durch Wasser gibt GRABOW (29).

Aber auch auf Kartoffelsalat, der zudem in großem Umfang von der Lebensmittelindustrie hergestellt wird, muß als Hepatitisvektor hingewiesen werden (35).

Anschließend sei noch ein Fall erwähnt, der zeigt, welche kuriose epidemiologische Wege bei der Übertragung der Hepatitis möglich sind. So berichtet GARIBALDI (27) von 95 Hepatitiserkrankungen im Frühsommer 1970, die als gemeinsame epidemiologische Infektionsquelle ein Café hatten. Als Infektionsursache wurde der dort angebotene Kaffee angesehen; denn fluoreszierender Farbstoff, der in die Toilette des Cafés geschüttet wurde, erschien nach 20 Tagen im Leitungswasser, das als Kaffeewasser verwendet wurde.

2.2 Enteroviren

Im Rahmen epidemiologischer Untersuchungen hatten die Enteroviren eine ähnlich große Bedeutung hinsichtlich ihrer Verbreitung; auch sie wurden vielfach wie Hepatitisviren durch Lebensmittel übertragen.

GOLDSTEIN (28) berichtet von 17 Kadetten einer Marineanstalt, die 1943 an Polioencephalitis erkrankten, und von weiteren 100 mit Symptomen einer abortiv verlaufenden Poliomyelitis. Im Rahmen der epidemiologischen Untersuchungen kam man zu der Ansicht, daß die Trinkmilch der Marinestation durch Fliegen kontaminiert worden war, die direkten Zugang zur Kantinentoilette hatten.

JUBB (42), DINGMANN (22), KNAPP (45), LIPARI (57) und AYCOCK (6) berichten ebenfalls von Poliomyelitis-erkrankungen infolge Genusses infizierter Milch. ALBANO und FAMIGLIETTI (2), TOOMEY und AUGUST (91), WARD et al. (96), VAN ROOYEN und KIRK (92), LEPINE et al. (55) beschrieben die Viruscarrierfunktion von Gemüse und Salat; BARBER (7) weist auf Früchte, insbesondere Erdbeeren, als potente Enteroviren-Überträger hin. MAZUR (65, 66) und LARKIN (53) ermittelten experimentell ebenfalls Gemüsepflanzen als Virusvektoren.

BONDARENKO (12) konnte neben Coxsackieviren und Echoviren auch andere nicht identifizierte Viren im Abwaschwasser von Karotten, Kartoffeln, Rettich, Tomaten, Früchten, Beeren, Lattich und Gurken nachweisen.

FUGATE (26) entdeckte in zum Verzehr bestimmten Austern neben Echoviren auch Polioviren (Typ 1 - 3). Ebenfalls enthielten importierte, gefrorene Austern Polioviren (Typ 1).

DI GIROLAMO (19) zeigte, daß auch Krabben mit Polioviren infiziert sein können.

BENDINELLI (9) isolierte aus zum Verkauf angebotenen Muscheln Echoviren, BELLELLI und LEOGRANDE (8) Echoviren und Polioviren. Dagegen konnte SCHÄFER (84), der im Winter auf dem Markt gekaufte Miesmuscheln auf Enteroviren untersuchte, keinen positiven Virusnachweis erbringen.

Neben HOCH (39), der sich ebenfalls mit der Übertragung von Virusinfektionen durch Nahrungsmittel beschäftigte, reicherte SULLIVAN (89) Enteroviren aus Hackfleisch an. AISEN (1) wies experimentell nach, daß Enteroviren auf gekochten Fleischbällchen ihre Infektionsaktivität über Stunden (36 Std.) beibehalten, und dementsprechend diese Lebensmittel als Viruscarrier in Frage kommen.

2.3 Andere Viren

Neben Hepatitis- und Enteroviren konnte man bei Untersuchungen von Lebensmitteln auch andere Viren nachweisen.

COUCH (16) isolierte aus Garnelen Baculoviren; JOHNSON (41) entdeckte in Krabben mit Hilfe des Elektronenmikroskopes Herpes-Virus ähnliche Partikel. CANDEIAS (13) fand in Trinkgläsern verschiedener Cafés und Bars neben Adeno- und Echoviren auch Herpesviren.

Aber auch Nahrungsmittel als Virusüberträger maligner Erkrankungen werden diskutiert. So ist LEMON (54) der Meinung, daß Milch, Milchprodukte und Eier hinsichtlich der Virusübertragung eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Leukosen zukommt. So reicherte LARKIN (52) z. B. aus Kuhmilch Rauscher-Leukämie-Viren an.

BERG (10) folgert, daß die Bedeutung der Nahrungsmittel als Virusüberträger sicher weitaus größer ist, als sie durch die gelegentlichen Ausbrüche Lebensmittel bedingter Viruserkrankungen dokumentiert wird.

3. Bisherige Untersuchungen zum Überleben von Viren in Lebensmitteln.

Hinsichtlich der Überlebensfähigkeit von Viren in Lebensmitteln wurde bisher am besten das Verhalten von Polioviren in Muscheln und Austern untersucht. HEDSTRÖM (33) untersuchte bereits 1964 europäische Austern in Bezug auf ihre Virusaufnahmefähigkeit. Mit Polioviren Typ III kontaminierte er ein meerwasserhaltiges Bassin, in dem sich 20 Austern befanden. Bereits nach 2 Stunden ließ sich in den Austern dieselbe Viruskonzentration wie im umgebenden Wasser feststellen. Nach 48 Stunden waren im Wasser keine Viren mehr nachweisbar, dagegen enthielten alle Austern noch nach 6 Tagen die Viren. In einer weiteren Versuchsreihe wurden Polioviren enthaltende Austern in ein virusfreies Wasserbassin umgesetzt. Über mehrere Stunden war keine Abnahme des Virusgehalts in den Austern festzustellen.

Neben METCALF (68), der ebenfalls die Infizierung von Austern mit Enteroviren erfolgreich demonstrieren konnte, wies auch MITCHELL (70) nach, daß Meeresschalentiere eine höhere Viruskonzentration aufweisen als das sie umgebende Milieu.

Die Experimente zeigten, daß das Fleisch der Schalentiere schon nach 1stündiger Virusexposition 27 mal mehr Viren enthielt als das umgebende Wasser. Die Viruskonzentrierung nahm noch bis zum Ende der 2. Stunde zu, dann erfolgte eine Stagnierung der Virusanreicherung.

Insgesamt ergaben alle Versuche, daß nach 3stündiger Exposition der Virustiter des Austernfleisches 10 mal höher als der des Bassinwassers war. Beachtenswert ist allerdings auch, daß eine schnelle Viruselimination erfolgen kann. Innerhalb von 8 Stunden sank nämlich der Virusgehalt der Austern um 95 % ab.

Aus diesen Ergebnissen ist zu folgern, daß Austern Viren speichern und bis zu einer beträchtlichen Menge akkumulieren können, was von CROVARI (17) auch bestätigt wird.

Nachdem nachgewiesen wurde, daß Viren von Meeresschalentieren aufgenommen werden (5, 40, 59) und Hauptsitz der Virusakkumulation der Verdauungstrakt ist, (56, 58) konnte weiter gezeigt werden, daß sich z. B. Coliphagen in Krabben zu einem bestimmten Prozentsatz auch aufs Blut und die Muskulatur verteilen (20).

DI GIROLAMO (18) wies nach, daß Viren in gekühlten, gefrorenen, gebratenen, gebackenen und gedämpften Austern überleben können. Seine Versuche ergaben, daß die Polioviren in Austern, die bei 5 °C gelagert waren, noch nach 30 Tagen nachweisbar sind; obwohl die Austern völlig verwest waren, waren noch 30 % der Viren lebensfähig.

Diese Ergebnisse stimmen mit Resultaten von LYNT (62) überein, nach denen Polio- und Cocksackieviren einen Monat lang in Lebensmittelprodukten, die bei 10 °C gelagert sind, überleben.

Nach HEIDELBAUGH (34) bleiben die gleichen Viren in Nahrungsmitteln für die Dauer von 5 Monaten infektiös, sofern sie bei -20 °C gelagert sind.

In einer weiteren Versuchsreihe von DI GIROLAMO (18) überlebten 40 % der Viren in tiefgefrorenen Austern 6 Wochen lang. Die Virusinaktivierung bei Dämpfen der Austern verlief relativ schnell. Dennoch überlebten 10 % der Polioviren in 8 Minuten lang gedämpften Austern. Auffällig ist jedoch, daß in gebratenen und gebackenen Austern die Virusüberlebensquote wiederum etwas höher war; 13 % der zugesetzten Viren überlebten 10minütiges Braten.

Aber auch durch trockene Hitze erfolgt keine vollständige Inaktivierung der Viren. Das zeigen u. a. Versuche, in denen die Tenazidität der Viren noch durch das jeweilige Umgebungsmedium heraufgesetzt wird. (4, 21, 69, 94, 95.) Die längere Überlebenszeit der Viren in Austern im Winter kann durch die infolge der niedrigen Temperaturen bedingten reduzierten Aktivität der Flora erklärt werden (11, 67).

4. Bisherige Versuche zur Anreicherung von Viren aus Lebensmitteln

In den meisten Untersuchungen zur Isolierung von Viren aus Lebensmitteln wurden keine Anreicherungssysteme verwendet.

LYNT (62) wies in Experimenten zum Nachweis und Überleben von Enteroviren in Nahrungsmitteln diese direkt ohne Anreicherung in den Lebensmittelsuspensionen nach.

Die Isolierung der Viren erfolgte dabei z. B. mit Hilfe der Äthylätherextraktion (31, 68, 70) oder durch Säurepräzipitation (47).

CLIVER und YEATMEN (15) konzentrierten Polio- und Coxsackieviren bei ihren Untersuchungen zum Vorkommen von Enteroviren in Lebensmitteln durch Ultrazentrifugation.

In Versuchen von HERRMANN und CLIVER (37) wurde vor der Ultrazentrifugation eine zusätzliche Vorreinigung vorgenommen. Nach Suspendierung von 25 g Käse als Modellprobe in 100 ml PBS bzw. Freon wurde zunächst zentrifugiert, der Überstand gegen Äthylenglykol dialysiert und das Dialysat anschließend ultrazentrifugiert. Die Virusverluste lagen je nach Wahl der Suspensionsflüssigkeiten zwischen 94 % und 67 %. In nachfolgenden Experimenten wurde die Anwendbarkeit dieser Verfahren an verschiedenen virusinfizierten Lebensmitteln wie Hackfleisch, Karotten, Kartoffelsalat usw. überprüft (38.)

Durch Modifikation der Versuchsanordnungen, nämlich durch vorherige Polyelektrolytflockung zur Vorklärung der Lebensmittelsuspension konnten in Experimenten mit Muscheln die Virusverluste unter 20 % gesenkt werden (49).

KOSTENBADER und CLIVER (50) entwickelten dann 1973 ein weiteres Verfahren zur Isolierung von Enteroviren aus Lebensmitteln.

Sie homogenisierten jeweils 20 g verschiedener Lebensmittelproben in 100 ml Glycin-NaOH-Puffer; diese Suspension wurde mit Filtern geklärt. Die anschließende Virusanreicherung erfolgte durch Ultrafiltration. Auf diese Weise konnten über 80 % der zugesetzten Viren nach Extraktion und Konzentrierung zurückgewonnen werden.

SOSBEY et al. (88) reicherten bei ähnlicher Versuchsanordnung Enteroviren aus Austern an. Die Austern wurden zunächst homogenisiert, zentrifugiert und das Zentrifugat anschließend in Glycinpuffer resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde der virushaltige Überstand zur Klärung filtriert. Die Konzentrierung der Viren erfolgte dann durch Ultrafiltration. Im Durchschnitt konnten 63 % der zugesetzten Viren zurückgewonnen werden.

SULLIVAN et al. (89), die Hackfleischproben auf das Vorkommen von Enteroviren untersuchten, suspendierten jeweils 5 g Proben in einer Nährlösung, anschließend wurde die Suspensionsflüssigkeit ultrafiltriert. Mit Hilfe dieses Verfahrens ließen sich in 3 von 12 zu untersuchenden Proben Enteroviren nachweisen.

THIERNEY et al. (90) bearbeiteten jeweils 100 g Proben. Die Klärung des Suspensionsflüssigkeit erfolgte durch weitmaschige Gaze, Glaswolle, Fiberglasfilter oder durch niedertourige Zentrifugation. Die Anreicherung der Viren aus den großen Suspensionsmengen wurde mit der Ultrafiltration durchgeführt. Diese Experimente zeigten, daß sich die Glaswolle und die Fiberglasfilter aufgrund der geringsten Virusverluste am besten zur Klärung eignen. Insgesamt konnten 20 % - 50 % der zugesetzten Viren aus den 100 g Lebensmittelproben zurückgewonnen werden.

Betrachtet man insgesamt die bisher beschriebenen Versuche zur Isolierung bzw. Anreicherung von Viren aus Nahrungsmitteln, so stellt man fest, daß die meisten Verfahren zum Nachweis einer Viruskontamination bei Meerestieren entwickelt wurden. Bei Experimenten mit anderen Lebensmittelprodukten wurden nur geringe Probenmengen (1 - 12 g) untersucht.

Aus allen Versuchen wird weiter deutlich, daß mit den bisherigen Verfahren eine geringe Viruskontamination nicht sicher nachzuweisen ist und daß nur aus kleinen Lebensmittelproben Viren ohne Anreicherungsverfahren nachgewiesen werden können. Will man jedoch größere Probenmengen auf ihren Virusgehalt untersuchen, so ist dies nur möglich, wenn man die Viren zunächst isoliert und anschließend anreichert.

Dabei kann aber auf eine Klärung der Lebensmittelsuspension nicht verzichtet werden, da die Nahrungsmittelreste sowohl die Viruskonzentrierung als auch die Virusnachweissysteme empfindlich stören.

5. Eigene Untersuchungen

5.1 Einführung und Problemstellung

Infolge neuerer Erkenntnisse nimmt das Interesse an der Virusübertragung durch Lebensmittel zu. So weist die WHO (98) ausdrücklich darauf hin, daß sowohl die Suche nach Viren in Nahrungsmitteln zu forcieren ist, als auch Isolierungsmethoden entwickelt bzw. verbessert werden müssen.

Hierzu sind Verfahren notwendig, die die Isolierung auch geringster Virusmengen aus dem Lebensmittel ermöglichen, da einerseits mit dem Vorkommen sehr geringer Infektionseinheiten zu rechnen ist, andererseits schon geringste Infektionsdosen nach oraler Aufnahme zum Angehen einer Infektion führen (79, 97). Daher müssen zum Nachweis von Viren in Nahrungsmitteln Anreicherungsverfahren angewendet werden.

Gleichzeitig ist aber die Entfernung von Lebensmittelbestandteilen unerlässlich, da sie die Virusnachweissysteme empfindlich stören. Bisher wurden hierzu fast ausschließlich Anreicherungsverfahren entwickelt, die zum Virusnachweis in Wasserproben eingesetzt wurden.

Unsere Fragestellung zielte daher darauf ab, ob sich bisher beschriebene Methoden zur Anreicherung von Viren in Wasser auch zum Virusnachweis in aufbereiteten Lebensmittelproben eignen. Folgende Probleme standen dabei im Vordergrund:

- A. Überführung der zu untersuchenden Nahrungsmittelprobe in einen Zustand, daß die gewählten Anreicherungsverfahren angewendet werden können.
- B. Weitestgehende Verhinderung eines Virusverlustes während der Aufarbeitung.
- C. Anpassung und Modifikation der bekannten Anreicherungsverfahren zum Virusnachweis in Lebensmitteln.

5.2 Material und Methodik

5.2.1 Virusmaterial

Als Modellvirus wählten wir Polioviren. Zur Kontamination setzten wir unseren Lebensmittelproben Gewebekulturüberstand zu, der auf HeLa-Zellen kultivierte Polio Impfviren Typ II (P 712-Ch-2-ab, Behring-Werke) enthielt. Die virushaltige Flüssigkeit wurde bei -28 °C gelagert. Der Virusgehalt des Gewebekulturüberstandes lag höher als 10^7 TCID₅₀.

5.2.2 Gewebekultur und Nährmedien

Als Gewebekultur zum Nachweis der Polioviren wurde eine HeLa-Zell-Linie verwendet. Die Anzucht des Zellmaterials erfolgte in einem Lactalbuminhydrolysat-Hefeextrakt-Medium auf Hanks Basis mit einem Zusatz von 10 % Kälberserum. Als Erhaltungsmedium für die beimpften Kulturen diente das gleiche Grundmedium, jedoch mit einem auf 5 % reduziertem Kälberserumgehalt.

5.2.3 Bestimmung des Virusgehaltes

Von den jeweiligen virushaltigen Lebensmittelproben wurden Verdünnungsreihen in log 0,6-Stufen hergestellt. Je Verdünnungsstufe verimpften wir 1 ml auf 4 Gewebekulturröhrchen. Nach 72stündiger Bebrütung erfolgte die Ablesung und Berechnung der TCID₅₀ nach der

Methode von REED und MÖNCH (81).

5.2.4

Lebensmittel

Für den Vergleich der Anreicherungsverfahren verwendeten wir Fleisch, Gemüse und Getränke. Als Fleischprobe nahmen wir Hackfleisch, später frisch zubereitetes Gulasch, das in einer Metzgerei gekauft wurde.

Als Gemüseproben wählten wir Feldsalat und Kopfsalat. Der Salat wurde regulär aus dem Handel bezogen.

Bei den flüssigen Lebensmitteln entschieden wir uns für handelsübliche Limonade und Bier. Die Wahl fiel auf diese, da deren Inhaltsstoffe ebenfalls die Anreicherung der Viren mit den verschiedenen Methoden erheblich stören können.

5.3

Aufbereitung der Lebensmittel vor der Virus-anreicherung

Nach der Viruskontamination mußten die Lebensmittel so aufbereitet werden, daß sie den verschiedenen Anreicherungsverfahren zugänglich wurden. Hierzu behandelten wir die Nahrungsmittelproben folgendermaßen:

5.3.1

Fleisch

Je 200 g der Fleischproben wurden mit 20 ml des poliovirushaltigen Gewebekulturüberstandes kontaminiert. Nach 15minütigem Antrocknen setzten wir 200 ml Hanks Lösung bzw. PBS zur Abtrennung der Viren hinzu. Bei der Hackfleisch-aufbereitung vermischten wir das Ganze mit einem Stabmixer.

Nach anschließender Zentrifugation mit 3100 U/Min. über 35 Minuten pipettierten wir den Überstand ohne die Fettschicht ab und sammelten ihn. Später wurde bei der Aufbereitung von Gulasch dieser nur in der Flüssigkeit gewaschen. Das "Waschwasser" bzw. den Überstand der Hackfleischsuspension nach der Zentrifugation klärten wir, um Begleitstoffe, die die Anreicherungssysteme stören, zu entfernen. Zur Klärung kamen zum Einsatz:

- a) engmaschiges Mull
- b) AP 20 Vorfilter (Fa. Millipore, d = 100 mm)
- c) MF Membranfilter (Fa. Sartorius, Typ 11005 und Typ 11306, Porenweite 0,6 μ , d = 100 mm)
- d) DAWP Filter (Fa. Millipore, Typ 25 09025, Porenweite 0,65 μ , d = 100 mm)

Die Filtration erfolgte mit Unterdruck.

Im Anschluß an die Filtration folgte dann die Anreicherung der Viren aus dieser Flüssigkeit. Nach jeder Aufbereitung erfolgte der quantitative Virusnachweis zur Bestimmung der Virusverluste.

5.3.2 Salate

Als Salatproben benutzten wir Feld-, später Kopfsalat. Vor Verwendung der Proben wurde der Salat gewaschen und getrocknet. Nach Kontamination von 200 g Salat mit Virusflüssigkeit und anschließender 15minütiger Trocknung bei Zimmertemperatur versetzten wir die Proben mit 200 ml Hanks-Lösung und schüttelten sie in einem geschlossenen Behälter gut durch. Die "Waschflüssigkeit" wurde dann zur Klärung durch ein Membranfilter (Fa. Sartorius, Porenweite $0,6 \mu$, $d = 100 \text{ nm}$) filtriert.

In einer weiteren Versuchsanordnung zerkleinerten wir die Proben nach der Viruskontamination und Zusatz von 200 ml Hanks-Lösung bzw. PBS mit einem Ultra-Thurax-Stabmixer und zentrifugierten dann mit 3100 U/min. 35 Minuten lang.

Anschließend wurde der Überstand gesammelt. Die Klärung erfolgte dann mit Hilfe der Filtration wie bei den Fleischproben.

5.3.3 Flüssige Nahrungsmittel

Limonade und Bier.

Nach Austreiben der Kohlensäure durch 25minütiges Rühren mit einem Magnetrührer und Einstellen des pH auf 7,2 beimpften wir 200 ml der flüssigen Proben mit 2 ml Virussuspension. Anschließend legten wir ohne Vorfiltration die Anreicherungsverfahren direkt an.

5.4 Virusanreicherung

Nach Homogenisierung bzw. Abwaschung, Zentrifugation und Vorfiltrationen der Lebensmittelproben wurden die Viren aus den Suspensionen angereichert. Hierzu führten wir vergleichsweise die Alginatfiltration, das 2-Phasen-System und die Flockungsmethode durch.

5.4.1 Alginatfiltration

Zur Gewinnung und Anreicherung der Viren aus den verschiedenen Flüssigkeiten verwendeten wir Alginat Filter der Fa. Sartorius mit einem Durchmesser von 47 mm. Aufgrund der langen Filtrationsdauer und der technischen Schwierigkeiten wurden in diesen Anreicherungsversuchen nur 100 ml der "Waschflüssigkeiten" bzw. der flüssigen Lebensmittelproben mit Unterdruck filtriert.

Nach Abschluß der Filtration wurde der Filter in 2 ml einer 3,8 % Na-Citrat-Lösung aufgelöst. In dieser Lösung erfolgte dann der quantitative Virusnachweis zur Ermittlung des Virusverlustes bei der Anreicherung.

5.4.2 . 2-Phasen-System

Zur Anreicherung der Viren mit dem 2-Phasen-System hielten wir uns an die Vorschriften von ALBERTSSON (3) bzw. an die Verfahrensweise, wie sie LUND (60) bei Abwasserproben durchgeführt hatte.

Wir setzten 200 ml "Waschflüssigkeit" von Fleisch und Gemüse bzw. 200 ml Limonade oder Bier 20 g 5 M NaCl, 2,7 g 20 % Dextransulfat und 58 g 30 % Polyäthylenglykol hinzu. Nach Einstellen des pH auf 7,2 und 1stündigem Rühren mit einem Magnetrührer wurde die Flüssigkeit in einen Scheidetrichter abgefüllt und über 18 Stunden bei +4 °C aufbewahrt. Während dieser Zeit bildeten sich eine Unter-, Zwischen- und Oberphase aus. Mit einer Pasteur Pipette wurden anschließend die Boden- und die Zwischenphase entnommen und mit KCl im Verhältnis 1 : 0,7 versetzt. Das deutlich sichtbar ausfallende Dextransulfat wurde abzentrifugiert; im Überstand erfolgte dann die quantitative Virusbestimmung zur Virusverlustberechnung.

5.4.3

FeCl₃-Flockung kombiniert mit dem 2-Phasen-System

In unseren Versuchen verwendeten wir als Flockungsmittel FeCl₃. Nach Einstellen des pH der 200 ml Flüssigkeit auf 7,2 mit 1 N NaOH wurde unter ständigem Rühren (Magnetrührer) das Flockungsmittel langsam hinzugegeben; 2 ml einer 0,18 N wässrigen FeCl₃-Lösung pro 100 ml Lebensmittel-flüssigkeit waren für eine ausreichende Flockenbildung notwendig.

Während der FeCl₃ Zugabe wurde der pH mit 3 % Ammoniak auf 7,2 gehalten. Nach beendigter Flockenbildung wurden die Flocken 1 Stunde lang mit einem Magnetrührer langsam in Bewegung gehalten; anschließend sedimentierten sie

30 Min. lang und wurden dann mit Hilfe eines HAWP-Filters (Fa. Millipore, d = 50 mm bzw. 90 mm) abfiltriert. Die auf dem Filter verbliebenen nicht angetrockneten Flocken wurden mit 5 bis 15 ml 3 %igem in 0,25 M K_2HPO_4 gelöstem Beefextrakt versetzt.

Unter vorsichtigem Rühren mit einem rechtwinklig abgebogenen Glasstab tropfte der Extrakt ab; mit einer Saugflasche wurde zum Schluß der Vorgang beschleunigt. Nach Bestimmung des Virustiters wurde das Filtrat mit Hanks-Lösung auf 200 ml aufgefüllt und ein 2-Phasen-System wie unter 5.4.2 angegeben zur weiteren Virusanreicherung angelegt.

6. Ergebnisse

6.1 Vorversuche

In ersten orientierenden Versuchen wurden mit Ausnahme von Bier und Limonade 200 g Lebensmittelproben in 200 ml Hanks-Salzlösung suspendiert und mit einem Ultrathurax-Stab bzw. Haushaltsmixgerät homogenisiert.

Nach Zentrifugation und anschließender Filtration durch verschiedene Filter (Membranfilter der Fa. Sartorius, Fa. Millipore) wurde die Virusanreicherung aus der Suspensionsflüssigkeit mit dem 2-Phasen-System, der Alginatfiltration, bzw. einer Eisenflockung kombiniert mit dem 2-Phasen-System durchgeführt. Die bei der Lebensmittelaufbereitung und Anreicherung der Viren aus den Lebensmitteln entstandenen Verluste in Versuchen mit Fleisch sind aus Tab. 1, mit Salat in Tab. 2, 3 und 4 ersichtlich.

Tabelle 1 - Viruswiedergewinn aus Hackfleisch mit dem 2-Phasen-System.

Versuch	Virusmenge (ID ₅₀) im Hackfleischbrei	Virusmenge (ID ₅₀) im Dextransulfat	Viruswieder- gewinn (%)	durchschnittlicher Viruswiedergewinn
I	4,7 x 10 ^{4,8}	0,53 x 10 ^{2,94}	0,16	
II	4,75 x 10 ^{4,65}	0,75 x 10 ^{3,6}	1,4	
III	4,7 x 10 ^{5,0}	1,0 x 10 ^{3,0}	0,21	0,53
IV	4,7 x 10 ^{4,8}	1,17 x 10 ^{2,93}	0,34	

Tabelle 2 - Viruswiedergewinn aus Feldsalat mit dem 2-Phasen-System

Versuch	Virusmenge (ID ₅₀) im Salatbrei	Virusmenge im Dextranulfat (ID ₅₀)	Viruswiedergewinn (%)	durchschnittlicher Virusgewinn (%)
I	2,42 x 10 ^{5,8}	2,11 x 10 ^{4,8}	8,7	
II	2,48 x 10 ^{5,4}	3,26 x 10 ^{4,7}	26,29	
III	4,0 x 10 ^{5,2}	1,4 x 10 ^{4,3}	4,41	9,95
IV	2,0 x 10 ^{4,5}	2,3 x 10 ^{2,9}	2,88	
V	4,5 x 10 ^{5,5}	6,7 x 10 ^{4,2}	7,45	

Tabelle 3 - Viruswiedergewinn aus Feldsalat mit der Alginatfiltration

Versuch	Virusmenge (ID ₅₀) in 100 ml Suspensions- flüssigkeit	Virusmenge (ID ₅₀) in 2 ml 3,8 % Na-Citrat	Viruswiedergewinn (%)	durchschnittlicher Virusgewinn (%)
I	10 ^{5,1}	2 x 10 ^{3,6}	6,32	
II	10 ^{5,0}	2 x 10 ^{2,0}	0,2	
III	10 ^{5,4}	2 x 10 ^{2,13}	0,1	
IV	10 ^{5,4}	2 x 10 ^{2,93}	0,67	5,09
V	10 ^{5,4}	2 x 10 ^{4,46}	23,0	
VI	10 ^{5,6}	2 x 10 ^{2,7}	0,25	

Tabelle 4

- Viruswiedergewinn aus Salat mit der FeCl_3 -Flockung

Versuch	Virusmenge (ID ₅₀) in 100 ml Suspensions- flüssigkeit	Virusmenge (ID ₅₀) in 1 ml Beefextrakt	Viruswiedergewinn (%)	durchschnittlicher Virusgewinn (%)
I	$10^{5,7}$	$10^{4,46}$	5,76	
II	$10^{5,7}$	$10^{4,0}$	2,0	
III	$10^{5,9}$	$10^{4,26}$	2,3	3,82
IV	$10^{5,9}$	$10^{4,6}$	5,2	

Wie Tabelle 1 zeigt, waren die Virusverluste in den Versuchen mit Hackfleisch und dem 2-Phasen-System sehr hoch. Der durchschnittliche Viruswiedergewinn lag bei 0,53 %. Zusätzlich zu dem sehr hohen Verlust traten erhebliche technische Schwierigkeiten auf. Die Zentrifugation der Lebensmittelsuspension reichte nicht aus, um sie von Fleischbestandteilen zu befreien. Um die anschließende Anreicherung mit dem 2-Phasen-System durchführen zu können, mußte zusätzlich eine Filtration durchgeführt werden.

Mull erwies sich zur Klärung ungeeignet, da zuwenig Lebensmittelbestandteile zurückgehalten wurden. Die alleinige Anwendung verschiedener Membranfilter (Fa. Sartorius, Fa. Millipore) war ebenfalls nicht möglich, da sie bereits nach Filtration geringster Flüssigkeitsmengen verstopften. Erst durch eine Kombination von Papierfaltenfiltern und Membranfiltern wurde eine ausreichende Klärung möglich.

Trotz optischer Klarheit der Suspensionsflüssigkeit nach der Filtration reichte dieser Arbeitsgang nicht zur Behebung aller Schwierigkeiten aus. So ergaben sich teilweise bei der anschließenden Virusanreicherung mit dem 2-Phasen-System nicht immer eine deutliche Trennung der Phasen.

In den Versuchen zur Anreicherung der Viren aus Salat mit dem 2-Phasen-System lagen die durchschnittlichen Virusverluste zwischen dem Homogenisat und der Anreicherungsflüssigkeit bei 90 % (Tab. 2).

Die Anwendung der Ultrafiltration als Anreicherungsverfahren machte ebenfalls große Schwierigkeiten, da die Alginatfilter frühzeitig verstopften; der Virusverlust betrug 95 % (Tab. 3).

In den Versuchen mit der Flockungsmethode lag der durchschnittliche Verlust der dem Salat zugesetzten Viren bei 96 % (Tab. 4).

Aufgrund dieser erheblichen Schwierigkeiten bei der Klärung der Suspensionsflüssigkeiten, der technischen Durchführung und der sehr hohen Virusverluste während der Lebensmittelaufbereitung wurde in den Hauptversuchen auf die Homogenisierung der Nahrungsmittelproben in Hanks-Salzlösung bzw. PBS verzichtet, da die Virusverluste auf die starke Manipulation bei der Probenaufbereitung und auf eine mögliche Adsorption der Viren an partikuläre Lebensmittelbestandteile der Suspension zurückgeführt werden mußten.

6.2 Hauptversuche

6.2.1 Virusanreicherung aus Lebensmitteln mit Hilfe des 2-Phasen-Systems

Aufgrund der Vor Versuchsergebnisse wurden in den Hauptversuchen die Lebensmittelproben nach folgendem Schema aufbereitet:

Nach der Viruskontamination erfolgte die Suspendierung der Nahrungsmittelproben in Hanks-Salzlösung ohne Homogenisierung. Im Anschluß an Zentrifugation und Filtration mit Papierfaltenfiltern und Membranfiltern (Fa. Sartorius, Typ 11005 und Typ 11306, Porenweite $0,6\ \mu$, $d = 100\ \text{mm}$, Fa. Millipore, Typ 25 09025, Porenweite $0,65\ \mu$, $d = 100\ \text{mm}$) der Suspensionsflüssigkeit wurde die Anreicherung der Viren mit dem 2-Phasen-System durchgeführt.

Die Ergebnisse der Volumeneinengung der Lebensmittelproben, der Virusanreicherung und der Virusverluste zwischen den einzelnen Aufbereitungsschritten gehen aus den Tabellen 5 - 10 hervor.

Tabelle 5

- Viruswiedergewinn aus Gulasch mit dem 2-Phasen-System

Versuch	(1) Virusmenge (ID ₅₀) Input	(2) Virusmenge (ID ₅₀) in der Suspendi- onsflüssigkeit	(3) Virusmenge (ID ₅₀) im Dextransulfat	Virusver- lust (%) 1 - 2	Virusver- lust (%) 2 - 3	Viruswieder- gewinn (%)	Virusan- reicherung
I	$2 \times 10^{6,38}$	$2 \times 10^{6,38}$	$5,26 \times 10^5$	0	89,04	10,96	4,38
II	$2 \times 10^{6,38}$	$2 \times 10^{6,38}$	$4,0 \times 10^{5,4}$	0	79,0	21,0	11,04
III	$2 \times 10^{5,94}$	$2 \times 10^{5,8}$	$5,57 \times 10^{4,7}$	27,55	77,92	16,0	6,03
IV	$2 \times 10^{6,1}$	$2 \times 10^{6,1}$	$6,84 \times 10^{5,0}$	0	72,83	27,17	8,35
V	$2 \times 10^{6,1}$	$2 \times 10^{6,1}$	$4,94 \times 10^{4,94}$	0	81,04	18,96	7,27
VI	$2 \times 10^{5,4}$	$2 \times 10^{5,4}$	$2,05 \times 10^{4,9}$	0	67,55	32,45	3,31
			Durchschnitt (%)	4,6	77,89	21,04	6,73

Tabelle 6 - Volumina in den Versuchen mit Gulasch und dem 2-Phasen-System

Versuch	Gulaschmenge (g)	Suspensions- flüssigkeits- menge (ml)	Dextransulfat- menge (ml)	Volumenein- engung
I	200	200	5,0	40
II	200	200	3,8	52,63
III	200	200	5,3	37,73
IV	200	200	6,5	30,76
V	200	200	4,7	42,55
VI	200	200	19,5	35,65
Durchschnitt	200	200	7,47	35,65

Tabelle 7 - Viruswiedergewinn aus Limonade mit dem 2-Phasen-System

Versuch	(1) Virusmenge Input	(2) Virusmenge (ID ₅₀) in der Limonade	(3) Virusmenge (ID ₅₀) im Dextranulfat	Virusver- lust (%) 1 - 2	Virusver- lust (%) 2 - 3	Viruswieder- gewinn (%)	Virusan- reicherung
I	$2 \times 10^{4,5}$	$2 \times 10^{4,5}$	$2,0 \times 10^{4,4}$	0	20,56	79,44	83,37
II	$2 \times 10^{4,5}$	$2 \times 10^{4,5}$	$1,89 \times 10^{4,5}$	0	5,5	94,5	105,0
III	$2 \times 10^{4,5}$	$2 \times 10^{4,5}$	$1,78 \times 10^{4,5}$	0	11,0	89,0	104,7
IV	$2 \times 10^{4,5}$	$2 \times 10^{4,5}$	$1,89 \times 10^{4,5}$	0	5,5	94,5	105,0
V	$2 \times 10^{3,2}$	$2 \times 10^{3,2}$	$1,55 \times 10^{2,86}$	0	64,58	35,42	47,86
VI	$2 \times 10^{3,2}$	$2 \times 10^{3,2}$	$1,57 \times 10^{3,2}$	0	11,50	88,5	104,66
VII	$2 \times 10^{3,2}$	$2 \times 10^{3,2}$	$1,47 \times 10^{3,1}$	0	63,17	36,83	52,71
			Durchschnitt (%)	0	25,96	74,02	86,18

Tabelle 8 - Volumina in den Versuchen mit Lomonade und dem 2-Phasen-System

Versuch	Limonadenmenge (ml)	Dextransulfatmenge (ml)	Volumeneinengung
I	200	1,9	105,26
II	200	1,8	111,11
III	200	1,7	117,64
IV	200	1,8	111,11
V	200	1,48	135,13
VI	200	1,5	133,33
VII	200	1,4	142,85
Durchschnitt	200	1,65	122,34

Tabelle 9 - Viruswiedergewinn aus Salat mit dem 2-Phasen-System

Versuch	(1) Virusmenge Input	(2) Virusmenge (ID ₅₀) in der Suspen- sionsflüssigkeit	(3) Virusmenge (ID ₅₀) im Dextranulfat	Virusver- lust (%) 1 - 2	Virusver- lust (%) 2 - 3	Viruswieder- gewinn (%)	Virusan- reicherung
I	10 ^{6,4}	2 x 10 ^{6,1}	2,4 x 10 ^{5,3}	0	81,4	19,05	16,71
II	10 ^{6,4}	2 x 10 ^{6,1}	1,82 x 10 ^{6,06}	0	17,0	83,17	96,71
III	10 ^{6,6}	2 x 10 ^{6,3}	2,57 x 10 ^{5,3}	0	87,12	12,88	10,55
VI	10 ^{6,6}	2 x 10 ^{6,3}	2,4 x 10 ^{5,43}	0	83,8	16,22	14,23
			Durchschnitt	0	67,24	32,83	34,55

Tabelle 10 - Volumina in den Versuchen mit Salat und dem 2-Phasen-System.

Versuch	Salatmenge (g)	Suspensions- flüssigkeits- menge	Dextransulfatmenge (ml)	Volumeneingengung
I	200	200	2,28	87,71
II	200	200	1,72	116,27
III	200	200	2,44	81,96
VI	200	200	2,28	87,71
Durchschnitt	200	200	2,18	93,41

Aus den Tabellen wird ersichtlich, daß mit dieser Versuchsanordnung die Probenvolumina verschieden eingeengt werden konnten.

In den Experimenten mit dem 2-Phasen-System wurden die 200 g Fleischproben um das 36fache, die Salatproben um das 93fache und die Limonade sogar um das 122fache eingeengt. (Tab. 6, 8, 10). Die unterschiedlichen Volumeneinengungen in Abhängigkeit von der Lebensmittelart waren durch die verschieden stark ausgebildeten Boden- und Interphasen bedingt.

Betrachtet man die Versuchsergebnisse mit Fleisch (Tab. 5), so konnten die Virusverluste im Vergleich zu den Vorversuchen (Tab. 1) von 99,5 % auf 79 % gesenkt werden. Im Durchschnitt wurden die Polioviren durch die Anreicherung um das 6,7fache konzentriert; das bedeutet, daß bei einem Vergleich der Viruskonzentrationen in 1 ml Ausgangssubstrat mit der in 1 ml Endprodukt bei 36facher Einengung des Probenvolumens eine ca. 7fache Virusanreicherung stattgefunden hat.

Betrachtet man die Verlustraten zwischen den einzelnen Aufbereitungsschritten, so erkennt man, daß das gesamte dem Fleisch zugesetzte Virusmaterial nach Suspendierung wieder in der Suspensionsflüssigkeit erscheint. Bei der Isolierung der Viren aus den Fleischproben sind daher die Verluste bei der Klärung durch Filtration und der Anreicherung mit dem 2-Phasen-System aufgetreten.

Die Versuche mit Kopfsalat erbrachten bessere Ergebnisse als in den Vorversuchen (Tab. 9 und 10). Es war sowohl eine höhere Einengung der Proben-
volumina (durchschnittlich 93fach) als auch eine
größere Virusanreicherung (durchschnittlich
35fach) möglich. Gleichzeitig wiesen diese
Experimente geringere Virusverluste auf. So
konnten ca. 33 % der zugesetzten Viren wieder-
gewonnen werden. Entsprechend den Versuchen mit
Fleisch traten auch hier die Verluste bei der
Vorfiltration der Suspensionsflüssigkeit und bei
der anschließenden Anreicherung mit dem 2-Phasen-
System auf.

Die besten Ergebnisse erzielten wir mit der
Limonade (Tab. 7 und 8). Bei einer 122fachen
Volumeneinengung konnte im Durchschnitt eine
86fache Virusanreicherung bei einem Virusrück-
gewinn von 74 % erreicht werden. Diese guten
Befunde sind darauf zurückzuführen, daß bei der
Virusanreicherung aus Limonade keine Filtration
zur Klärung durchgeführt werden mußte. Die aufge-
tretenen Verluste sind daher auf die Anreicherung
mit dem 2-Phasen-System zurückzuführen.

6.2.2 Virusanreicherung aus Lebensmitteln mit der Alginatfiltration

In den Experimenten zur Anreicherung der Polioviren aus Lebensmitteln mit Hilfe der Alginatfiltration wurden im Gegensatz zu den übrigen Versuchen mit 100 g bzw. 100 ml Proben gearbeitet, da in den Vorversuchen nur unter größten Schwierigkeiten eine Filtration möglich war.

Nach Kontamination der Nahrungsmittelproben mit virushaltigem Gewebekulturüberstand und Suspendierung der Proben in 100 ml Hanks-Salzlösung wurde wie in den vorhergehenden Versuchen mit Fleisch und Salat die Suspensionsflüssigkeit durch eine Filtration mit Papierfaltensfilter und Membranfilter geklärt. Anschließend erfolgte die Anreicherung der Viren aus der Suspensionsflüssigkeit mittels Alginatfiltration. Trotz Klärung war die Filtration mit dem Alginat noch erheblich schwierig.

So benötigten wir für eine Filtration von 100 ml geklärter Suspensionsflüssigkeit mit dem Alginatfilter über 8 Stunden. Systembedingt wurde in diesen Versuchen unabhängig von der Lebensmittelart eine Einengung von 100 ml Probenvolumen auf 2 ml Citratlösung, also um das 50fache, erreicht. Die Anreicherungs-faktoren und die Virusverlust-raten sind in den Tabellen 11 bis 16 dargestellt.

Tabelle 11 - Viruswiedergewinn aus Gulasch mit der Alginatfiltration

Versuch	(1) Virusmenge (ID ₅₀) Input	(2) Virusmenge (ID ₅₀) in der Suspen- sionsflüssigkeit	(3) Virusmenge (ID ₅₀) im Natriumcitrat	Virusver- lust (%) 1 - 2	Virusver- lust (%) 2 - 3	Viruswiedergewinn (%)	Virusan- reicherung
I	10 ^{6,38}	10 ^{6,38}	2 x 10 ^{6,0}	0	16,62	83,38	41,68
II	10 ^{5,4}	10 ^{5,4}	2 x 10 ^{4,8}	0	49,76	50,24	25,11
III	10 ^{5,4}	10 ^{5,38}	2 x 10 ^{4,8}	4,5	47,38	50,24	25,11
IV	10 ^{7,1}	10 ^{7,1}	2 x 10 ^{6,4}	0	60,08	39,92	20,0
V	10 ^{7,1}	10 ^{6,89}	2 x 10 ^{6,4}	38,34	35,28	39,99	20,0
			Durchschnitt	8,56	41,82	52,75	26,38

Tabelle 12 - Volumina in den Versuchen mit Gulasch und der Alginatfiltration.

Versuch	Fleischmenge (g)	Suspensions- flüssigkeits- menge (ml)	Citratmenge (ml)	Volumeneinengung
I	100	100	2	50
II	100	100	2	50
III	100	100	2	50
IV	100	100	2	50
V	100	400	2	50
Durchschnitt				50

Tabelle 13

- Viruswiedergewinn aus Kopfsalat mit der Alginatfiltration.

Versuch	(1) Virusmenge Input	(2) Virusmenge (ID ₅₀) in der Suspen- sionsflüssigkeit	(3) Virusmenge (ID ₅₀) im Natriumcitrat	Virusver- lust (%) 1 - 2	Virusver- lust (%) 2 - 3	Viruswiedergewinn (%)	Virusan- reicherung
I	$5 \times 10^{5,4}$	$10^{5,1}$	$2 \times 10^{3,6}$	89,98	93,68	0,63	0,21
II	$5 \times 10^{5,1}$	$10^{5,0}$	$2 \times 10^{2,0}$	84,12	99,8	0,03	0,019
III	$5 \times 10^{5,4}$	$10^{6,1}$	$2 \times 10^{2,13}$	0	99,98	0,02	0,005
IV	$5 \times 10^{5,4}$	$10^{6,1}$	$2 \times 10^{2,93}$	0	99,86	0,14	0,067
V	$5 \times 10^{5,6}$	$10^{6,2}$	$2 \times 10^{4,46}$	20,36	96,36	2,98	1,45
VI	$5 \times 10^{5,6}$	$10^{6,3}$	$2 \times 10^{2,7}$	0	99,95	0,45	0,025
			Durchschnitt	32,41	98,27	0,7	0,3

Tabelle 14 - Volumina in den Versuchen mit Kopfsalat und der Alginatfiltration.

Versuch	Salatmenge (g)	Suspensions- flüssigkeits- menge (ml)	Citratmenge (ml)	Volumeneinengung
I	100	100	2	50
II	100	100	2	50
III	100	100	2	50
IV	100	100	2	50
V	100	100	2	50
VI	100	100	2	50
Durchschnitt				50

Tabelle 15 - Viruswiedergewinn aus Limonade mit der Alginatfiltration.

Versuch	(1) Virusmenge (ID ₅₀) Input	(2) Virusmenge (ID ₅₀) in der Limonade	(3) Virusmenge (ID ₅₀) im Natriumcitrat	Virusver- lust (%) 1 - 2	Virusver- lust (%) 2 - 3	Viruswiedergewinn (%)	Virusan- reicherung
I	10 ^{6,2}	10 ^{6,2}	2 x 10 ^{5,74}	0	30,64	69,36	34,67
II	10 ^{6,0}	10 ^{5,7}	2 x 10 ^{5,4}	49,8	0	50,2	25,1
III	10 ^{6,4}	10 ^{5,9}	2 x 10 ^{5,6}	68,3	0	31,7	15,9
IV	10 ^{6,0}	10 ^{6,0}	2 x 10 ^{5,06}	0	77,02	22,98	11,49
V	10 ^{3,2}	10 ^{3,2}	2 x 10 ^{2,66}	0	42,4	57,6	28,8
Durchschnitt				23,62	30,01	46,36	23,19

Tabelle 16 - Volumina in den Versuchen mit Limonade und der Alginatfiltration.

Versuch	Limonadenmenge (ml)	Citratmenge (ml)	Volumeneinengung
I	100	2	50
II	100	2	50
III	100	2	50
IV	100	2	50
V	100	2	50

Die Aufarbeitung der Fleischproben und die Anreicherung der Viren aus den Lebensmittelsuspensionsflüssigkeiten ergaben im Durchschnitt eine Viruskonzentrierung um das 26fache; die Verluste betrugen dabei ca. 47 % (Tab. 11).

Ähnlich gute Ergebnisse bezüglich Virusanreicherung und Virusverlust erhielten wir in den Experimenten mit Limonade (Tab. 15). Der durchschnittliche Anreicherungsfaktor lag bei 23, die Virusverluste betrugen im Durchschnitt 54 %. Die Verlustraten während der einzelnen Aufarbeitungsschritte unterschieden sich hier allerdings sehr stark untereinander.

Während beim Fleisch die Virusverluste nach Kontamination und Suspendierung der Proben in Hanks-Lösung mit 9 % sehr gering ausfielen, wurden bei der Limonade 24 % der zugesetzten Polioviren inaktiviert. Bei der Anreicherung mit bzw. ohne Vorklärung der Suspensionsflüssigkeiten verhielten sich die Virusverluste jedoch umgekehrt.

In den Fleischversuchen gingen nach Klärung und Alginatfiltration 42 % der zugesetzten Viren verloren, in den Versuchen mit Limonade dagegen nur 30 %. Die höheren Virusverluste bei den Fleischversuchen sind durch die Vorfiltration bedingt.

Schlechteste Ergebnisse erbrachten die Experimente mit Salat. Da der durchschnittliche Anreicherungsfaktor bei 0,3 lag, fand somit keine Anreicherung statt. Weiter konnten nur 0,7 der dem Salat zugesetzten Viren nach der Anreicherung mit der Alginatfiltration wieder angezüchtet werden.

Sehr hohe Virusverluste traten dabei durch die Klärung mit dem Papierfaltenfilter und dem Membranfilter als auch bei der anschließenden Alginatfiltration auf (durchschnittlicher Verlust 98,3 %).

6.2.3 Virusanreicherung aus Lebensmitteln mit Hilfe
der Eisenflockung kombiniert mit dem 2-Phasen-
System

In den Versuchen mit dem kombinierten Anreicherungsverfahren - Eisenflockung mit dem nachgeschalteten 2-Phasen-System - konnten die höchsten Volumeneingungen der Lebensmittelproben erreicht werden. So wurden die 200 g Proben um mehr als das 100fache eingengt.

Die Ergebnisse der Virusanreicherung und Virusverluste der Lebensmittel werden aus den Tabellen 17 bis 22 ersichtlich.

Tabelle 17 - Viruswiedergewinn aus Gulasch mit der FeCl_3 -Flockung und anschließendem 2-Phasen-System

Versuch	(1) Virusmenge Input	(2) Virusmenge (ID ₅₀) in der Suspenden- sionsflüssigkeit	(3) Virusmenge (ID ₅₀) in dem in 0,25 M K_2HPO_4 gelösten Beefextrakt	(4) Virusmenge (ID ₅₀) im Dextransulfat	Virusver- lust (%) 1 - 2	Virusver- lust (%) 2 - 3	Virusver- lust (%) 3 - 4	Viruswie- dergewinn (%)	Virusan- reicherung
I	$2 \times 10^{4,6}$	$2 \times 10^{4,6}$	$1,5 \times 10^{4,73}$	$1,47 \times 10^{4,4}$	0	0	54,1	46,38	66,25
II	$2 \times 10^{4,6}$	$2 \times 10^{4,6}$	$1,7 \times 10^{4,53}$	$1,47 \times 10^{4,1}$	0	27,65	69,40	22,14	33,18
III	$2 \times 10^{4,6}$	$2 \times 10^{4,6}$	$1,5 \times 10^{4,73}$	$1,3 \times 10^{4,2}$	0	0	74,44	25,87	41,72
IV	$2 \times 10^{5,2}$	$2 \times 10^{5,2}$	$10^{4,7}$	$2,0 \times 10^{4,2}$	0	84,2	37,0	10,0	11,11
V	$2 \times 10^{5,2}$	$2 \times 10^{5,2}$	$10^{4,85}$	$2,0 \times 10^{4,25}$	0	77,65	50,0	11,23	12,44
VI	$2 \times 10^{5,2}$	$2 \times 10^{5,2}$	$10^{4,85}$	$2,0 \times 10^{4,4}$	0	77,65	20,0	15,85	11,66
				Durchschnitt	0	44,52	50,82	21,91	29,39

Tabelle 18 - Volumina in den Versuchen mit Gulasch und der FeCl₃-Flockung kombiniert mit dem 2-Phasen-System

Versuch	Fleischmenge (g)	Suspensions- flüssigkeits- menge (ml)	Beefmenge (ml)	Dextransulfatmenge (ml)	Volumeneinengung
I	200	200	15	1,47	142,85
II	200	200	17	1,47	142,85
III	200	200	15	1,30	161,29
IV	200	200	10	2,0	111,11
V	200	200	10	2,0	111,11
VI	200	200	10	2,0	111,11

Durchschnitt

130,05

Tabelle 19 - Viruswiedergewinn aus Salat mit der FeCl₃-Flockung und anschließendem 2-Phasen-System

Versuch	(1) Virusmenge Input	(2) Virusmenge (ID ₅₀) in der Suspensions- flüssigkeit	(3) Virusmenge (ID ₅₀) in dem in 0,25 M K ₂ HPO ₄ gelösten Beefextrakt	(4) Virusmenge (ID ₅₀) im Dextransulfat	Virus- Virus- Virus- Virus- ver- ver- ver- ver- lust lust lust lust (%) (%) (%) (%) 1 - 2 2 - 3 3 - 4				Virusan- reicherung
I	2 x 10 ^{5,0}	2 x 10 ^{4,6}	10 ^{4,65}	2 x 10 ^{3,7}	60,18	44,0	77,6	5,02	5,89
II	2 x 10 ^{5,0}	2 x 10 ^{4,6}	10 ^{4,7}	2 x 10 ^{3,7}	60,18	37,0	80,0	5,02	5,89
III	2 x 10 ^{5,0}	2 x 10 ^{4,5}	10 ^{4,8}	2 x 10 ^{4,0}	68,37	0	31,8	10,0	10,0
Durchschnitt					62,91	27,0	63,13	6,68	7,26

Tabelle 20 - Volumina in den Versuchen mit Salat und der FeCl_3 -Flockung kombiniert mit dem 2-Phasen-System.

Versuch	Salatmenge (g)	Suspensionsflüssigkeitsmenge (ml)	Beefmenge (ml)	Dextransulfatmenge (ml)	Volumeneinengung
I	200	200	10	2	111,11
II	200	200	10	2	111,11
III	200	200	10	2	111,11
Durchschnitt					111,11

Tabelle 21

- Viruswiedergewinn aus Bier mit der FeCl_3 -Flockung und anschließendem 2-Phasen-System

Versuch	(1) Virusmenge Input	(2) Virusmenge (ID ₅₀) in Bier	(3) Virusmenge (ID ₅₀) in dem im 0,25 M gelösten Beef- extrakt	(4) Virusmenge (ID ₅₀) im Dextralsulfat	Virus- ver- lust (%)				Viruswieder- gewinn (%)	Virusan- reicherung
					1 - 2 2 - 3 3 - 4					
					(%)	(%)	(%)	(%)		
I	2 x 10 ^{5,2}	2 x 10 ^{5,2}	1,5 x 10 ^{4,83}	2 x 10 ^{4,1}	0	67,95	75,16	7,95		8,82
II	2 x 10 ^{5,2}	2 x 10 ^{5,2}	1,5 x 10 ^{5,03}	2 x 10 ^{4,35}	0	49,3	72,14	14,13		15,66
III	2 x 10 ^{5,2}	2 x 10 ^{5,2}	1,5 x 10 ^{5,13}	2 x 10 ^{4,45}	0	36,18	72,14	17,8		19,77
Durchschnitt					0	51,14	73,14	13,29		14,75

Tabelle 22 - Volumina in den Versuchen mit Bier und der FeCl_3 -Flockung kombiniert mit dem 2-Phasen-System.

Versuch	Biermenge (ml)	Beefmenge (ml)	Dextranulfatmenge (ml)	Volumeneinengung
I	200	15	2	111,11
II	200	15	2	111,11
III	200	15	2	111,11
Durchschnitt				111,11

In den Versuchen mit Fleisch (Tab. 17 und 18) konnten die Polioviren durchschnittlich um das 29fache konzentriert werden. Die Verluste lagen dabei um 78 %. Sie waren durch die Klärung mit Hilfe der Papierfalten- und Membranfilter, durch die Eisenflockung mit Beefextraktelution (45 %) und durch die Anreicherung mit dem 2-Phasen-System verursacht (51 %).

Im Vergleich zu den Fleischversuchen waren die Anreicherungsfaktoren in den Experimenten mit Salat und Bier erheblich kleiner (Faktor 7 bzw. 15). Zusätzlich waren in diesen Versuchen größere Virusverluste zu verzeichnen. Bei Salat betrugen sie durchschnittlich 93 %, bei Bier 87 %. Die hohen Verluste bei der Bearbeitung des Salates mußten auf die geringen Virusrückgewinnungsquoten nach der Kontamination des Salates und anschließender Suspension in Hanks-Salzlösung (Virusverlust 63 %) zurückgeführt werden.

Bei der Anreicherung der Polioviren aus Bier mit der Eisenflockung traten Verluste von 51 %, nach der Anreicherung mit dem 2-Phasen-System von 73 % auf.

6.3 Zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse

Bei der Betrachtung der 3 verschiedenen Anreicherungsverfahren unabhängig von der Wahl der Nahrungsmittel wird der größte Virusrückgewinn mit dem 2-Phasen-System erzielt (ca. 44 %, siehe Tab. 23).

Tabelle 23 - Übersicht über den Viruswiedergewinn mit Hilfe der 3 Anreicherungsverfahren unabhängig von der Wahl der Lebensmittel

	Anzahl der Versuche	durchschnittlicher Viruswiedergewinn (%)	Volumeneinengung	Virusanreicherung
2-Phasen-System	17	44,44	86,44	45,99
Alginatfiltration	16	31,24	50,0	15,60
Fe-Cl ₃ -Flockung kombiniert mit 2-Phasen-System	12	28,57	120,58	20,19

Mit Hilfe des Alginatfilters lassen sich ca. 1/3 aller den Nahrungsmitteln zugegebenen Viren isolieren. Läßt man die Alginatfiltrationsversuche mit Kopfsalat fort, so gewinnt man fast 50 % der zugegebenen Polioviren wieder.

Mit einem durchschnittlichen Virusrückgewinn von 29 % erbringt die Eisenflockung in Verbindung mit dem nachgeschalteten 2-Phasen-System den geringsten Virusnachweis. Dennoch läßt sich hier die größte Einengung der Probenvolumina (120fache Einengung) erzielen. Im Vergleich dazu war sie bei der Alginatfiltration nur 50fach.

Die ca. 86fache Einengung der Lebensmittelvolumina bei den Experimenten mit dem 2-Phasen-System nehmen die Mittelstellung ein. Neben dem größten Viruswiedergewinn ist in diesen Versuchen auch der Anreicherungsfaktor am größten (ca. 46fach), so daß dieses Anreicherungssystem unabhängig von den verschiedenen Nahrungsmitteln die besten Resultate liefert.

Die Versuche mit dem kombinierten Anreicherungssystem (FeCl_3 -Flockung mit anschließendem 2-Phasen-System) erbringen eine ca. 20fache Virusanreicherung, während die Alginatfiltration nur eine durchschnittliche 16fache Viruskonzentrierung aufweist.

Bei einem Vergleich der 3 verschiedenen Lebensmitteln unabhängig von der Wahl der verschiedenen Anreicherungssysteme werden aus dem viruskontaminierten Fleisch ca. $\frac{1}{3}$ der zugegebenen Polioviren wiedergewonnen (Tab. 24).

Tabelle 24 - Übersicht über den Viruswiedergewinn aus Lebensmitteln ohne Berücksichtigung der verschiedenen Anreicherungsverfahren.

	Anzahl der Versuche	durchschnittlicher Viruswiedergewinn (%)	Volumeneinengung	Virusanreicherung
Gulasch	17	30,69	82,35	20,50
Bier und Limonade	15	52,66	95,98	50,90
Salat	13	11,97	77,46	12,44

Aus Salat lassen sich dagegen nur ca. 12 % der Viren zurückgewinnen; ein Ergebnis, daß besser ausfällt, wenn man die Alginatfiltrationsversuche mit Salat außer Betracht läßt. Den größten Virusnachweis mit über 52 % der zugegebenen Viren erzielten wir in den Versuchen mit flüssigen Nahrungsmitteln (Bier und Limonade). Neben der höchsten Virusanreicherung (50fach) gelang auch die größte Volumeneinengung bei Bier und Limonade (ca. 96fache Einengung).

Während die Viruswiedergewinnungsraten bei den verschiedenen Lebensmitteln unabhängig von der Wahl der Anreicherungsverfahren recht große Differenzen aufweisen, liegen die Ergebnisse der Probenvolumina Einengung dicht nebeneinander (77-, 82- und 95fach).

Bei den Versuchen mit Salat ist sowohl der Viruswiedergewinn (ca. 12fach) als auch die Virusanreicherung (Faktor 12) am ungünstigsten ausgefallen. Die Experimente mit den flüssigen Lebensmitteln ergaben den größten Virusrückgewinn (ca. 52fach), die höchste Virusanreicherung (50fach) und die weitestgehende Einengung der Probenvolumina (95fach). Die Virusanreicherung bei den Versuchen mit Fleisch nimmt mit einer über 20fachen Konzentrierung die Mittelstellung ein.

7. Diskussion

Wie eingangs dargestellt, wurden vielfach Virus-erkrankungen des Menschen durch infizierte Lebensmittel ausgelöst. Aus der zunehmenden Enteritis-häufigkeit wird deutlich, daß weiterhin mit einem Anstieg der durch Lebensmittel übertragenen viralen Erkrankungen zu rechnen ist. Erhöhte Infektionsrisiken bestehen dabei vor allem bei der Massen-verköstigung, wobei für die epidemiologische Situation die Tatsache von Bedeutung ist, daß in der BRD 18 Millionen Personen, d. h. jeder dritte Bundesbürger, zumindest mittags in einer Werkküche oder Kantine verpflegt wird.

Während die bakteriologische Seite eine Analyse der Lebensmittel als Infektionsquelle und zusätzlich die Unterscheidung zwischen primärer und sekundärer Kontamination mit bakteriellen Infektionserregern zuläßt, wurden diesbezügliche Fragestellungen der virologischen Seite bisher nur unbefriedigend be-arbeitet.

Die Gefährdung des Menschen durch Viren unterscheidet sich grundlegend von der Gefährdung, die von Bakterien, Pilzen und deren Toxinen ausgeht. Bei den virusbe-dingten Schadwirkungen stehen nicht nur die spezifischen Erkrankungen wie z. B. Hepatitis und Poliomyelitis im Vordergrund, sondern es müssen auch gefährlichere Schadgruppen diskutiert werden, bei denen die Ursache - Wirkungsmechanismen sehr kompliziert sind (64).

Hierzu gehören das onkogene Risiko, synergistische Interaktion mit oportunistischen Problemviren, sich langsam entwickelnde chronische Krankheitsprozesse, persistierende Infektionen mit indirekter Schädigung und neue infektiöse Pathogene.

Aus diesen Gründen fordert MAYR (64) eine Bestandsaufnahme der viralen Erkrankungen des Menschen, die durch den Genuß viruskontaminierter Nahrungsmittel entstanden und daneben der bisher nachgewiesenen Viruskontaminationen von Lebensmitteln.

Ziel unserer Untersuchungen war es, in vergleichenden Experimenten verschiedene Anreicherungsverfahren an unterschiedlichen Nahrungsmitteln unter Berücksichtigung der Virusverlusten und der Lebensmittelvolumeneinengung zu erproben. Bei der Anreicherung der Viren aus den Lebensmitteln mußten zunächst die Polioviren von den Proben abgetrennt werden. Die Vorversuche zeigten, daß die Homogenisierung der Nahrungsmittel in Salzlösungen nicht zu einer Abtrennung der Viren führte; die Viren blieben an die Lebensmittel absorbiert.

Ein großer Nachteil dieser Verfahrensweise lag weiter darin, daß nach der Homogenisierung und Zentrifugation die Suspensionsflüssigkeit derart stark mit Lebensmittelbestandteilen belastet war, daß ein weiterer Aufbereitungsschritt, nämlich eine Filtration, notwendig wurde. Trotz Zentrifugation traten bei der weiteren Aufbereitung technische Schwierigkeiten auf. Vor allem führten diese Manipulationen zu solchen Virusverlusten, die uns veranlassten, in den Hauptversuchen auf die Homogenisierung der Lebensmittelproben zu verzichten.

Wir suspendierten daher die Nahrungsmittelproben in Hanks-Lösung; anschließend erfolgte eine Klärung mit einer Filterkombination Papierfaltenfilter und Membranfilter, die von PRIMAVESI (80) als geeignet empfohlen und von SCHÄFER (85) 1971 überprüft war. Nach dieser Vorbehandlung der Lebensmittelproben konnten die Anreicherungsversuche durchgeführt werden.

In den Hauptversuchen erwies sich dann bei einem Vergleich der 3 Anreicherungsverfahren unabhängig von der Lebensmittelart das 2-Phasen-System nach ABERTSSON (3) aufgrund der hohen Virusrückgewinnung und der größten Virusanreicherung bei guter Volumeneinengung insgesamt als die beste Methode. Vergleicht man nun die Ergebnisse der Versuche mit dem 2-Phasen-System mit den Resultaten von SHUVAL et al.(87), der mit diesem Verfahren Viren in Wasser anreicherte, so lag unser Virusverlust deutlich höher. Während unsere mittlere Verlustquote bei 57 % lag, schwankte sie bei ihm zwischen 2 % und 43 %.

Betrachtet man jedoch nur die Ergebnisse der Virusanreicherung aus flüssigen Lebensmitteln (Limonade und Bier), so wird deutlich, daß wir die gleichen Verlustraten hatten. Dieses Resultat stimmt auch mit den Ergebnissen von GRINDROD und CLIVER (30), LUND (61) und NUPEN (77) überein.

Die durchschnittlich höheren Verluste in den Versuchen mit festen Lebensmittelproben sind auf die zur Klärung der Suspensionsflüssigkeit notwendige Vorfiltration zurückzuführen, da die Viren vollständig von den Nahrungsmitteln in die Hanks-Salzlösung übergingen.

Das zweite angewandte Verfahren zur Anreicherung der Viren aus Lebensmitteln war die Alginatfiltration, mit der wir durchschnittlich 31 % der zugesetzten Viren zurückgewinnen konnten; jedoch war der Virusverlust insgesamt höher als bei den Versuchen mit dem 2-Phasen-System.

Trotz Klärung der Suspensionsflüssigkeit hatten wir technische Schwierigkeiten bei der Durchführung der Filtration, da häufig die Filter rasch verstopften. Aus diesem Grund mußten die Probenmengen auf 100 g bzw. 100 ml beschränkt werden. Dadurch wurde erreicht, daß die Suspensionsflüssigkeit innerhalb von 8 Stunden filtriert werden konnte.

Unsere durchschnittliche Viruswiedergewinnungsrate von 31 % stimmt mit den Resultaten von THIERNEY et al (90) überein, die in ihren Versuchen ca. 35 % der dem Fleisch zugesetzten Viren mit der Ultrafiltration zurückgewinnen konnten.

Im Gegensatz dazu gelang es KOSTENBADER und CLIVER (50) mit Hilfe der Ultrafiltration durchschnittlich 93 % der Viren nachzuweisen. Es ist aber zu bemerken, daß diese Autoren nur mit 20 g schweren

Nahrungsmittelproben arbeiteten. Wie wir verzichteten sie auch auf die Homogenisierung der Lebensmittel, jedoch reinigten sie die Suspension mit Flockungsmitteln vor.

Bei einem Vergleich unserer Ergebnisse mit der Alginatfiltration mit den anderer Autoren, die jedoch dieses Verfahren zur Isolierung von Viren aus Wasser einsetzten, zeigt es sich, daß unsere Verlustraten in fast gleicher Größenordnung lagen. SCHÄFER (85) erzielte in seinen Versuchen einen durchschnittlichen Virusrückgewinn von 38 %, NUPEN (77) fand bis zu 40 % seiner dem Wasser zugesetzten Viren wieder.

Die schlechtesten Resultate bei der Alginatfiltration lieferten die Salatproben. Während sich die Virusverluste bei der Suspendierung der Proben in Grenzen hielten (durchschnittlich 32 %), traten sehr hohe Verluste sowohl nach Klärung der Suspensionsflüssigkeit als auch durch die Ultrafiltration auf (98 %). Dies ist mit Sicherheit darauf zurückzuführen, daß die Polioviren an Salatbestandteile adsorbiert waren und damit durch die Vorfiltration eliminiert wurden. Diese Virusadsorption ist durch Untersuchungen von KONOWALCHUK (48) belegt, der mit Hilfe von Salatbrei Enteroviren aus Wasser adsorbieren und anreichern konnte.

In der 3. Versuchsreihe untersuchten wir die Möglichkeit der Isolierung und Anreicherung von Viren aus Lebensmitteln mit Hilfe der FeCl_3 -Flockungsmethode kombiniert mit dem 2-Phasen-System. Im Vergleich zu den Ergebnissen der Versuche mit dem 2-Phasen-System allein bzw. mit der Alginatfiltration konnte die größte Einengung der Probenvolumina erreicht werden. Allerdings war durch die sehr hohen Virusverluste, die im Durchschnitt 71 % betrugten, nur eine mäßige Viruskonzentrierung möglich. (20fach). Damit lag die Virusanreicherung über der Alginatfiltration (16fach), aber erheblich unter der mit dem 2-Phasen-System (46fach).

Betrachtet man nur den durchschnittlichen Virusverlust von 42 %, der durch die Flockung auftrat, so liegt er in der gleichen Größenordnung wie ihn SCHÄFER (85) nach Anwendung an Oberflächenwasser fand. Sein durchschnittlicher Virusverlust lag bei 37 %.

Im Gegensatz dazu gelang es jedoch KOSTENBADER und CLIVER (49) ca. 90 % der inokulierten Viren aus Muscheln mit dem Polyelektrolyt-Flockungsmittel Cat-Floc nachzuweisen.

Vergleicht man unseren durchschnittlichen Virusverlust bei Anwendung der Eisenflockung kombiniert mit dem 2-Phasen-System (71 %) mit dem von SCHÄFER (85), der mit diesem Verfahren Viren aus Oberflächenwasser anreicherte, so stellt man fest, daß sein mittlerer Virusverlust von 72,5 % unserem gleicht.

Betrachtet man die unterschiedlichen Viruswiedergewinnungsraten aus den jeweiligen Lebensmittelarten ohne Berücksichtigung der 3 verschiedenen Anreicherungsverfahren, so wird ersichtlich, daß in den Versuchen mit den flüssigen Nahrungsmittelproben die geringsten Virusverluste auftraten. Dies ist darauf zurückzuführen, daß bei den Experimenten mit Bier und Limonade keine Vorfiltration zur Klärung der Probenflüssigkeiten notwendig war und dadurch kein zusätzlicher Virusverlust auftrat. Nach SCHAFER (85) verliert man durch diese Vorfiltration im Mittel 45 % der zugesetzten Viren. Der Virusrückgewinn bei den Experimenten mit Fleisch lag bei ca. 31 %. In Salat konnten nur durchschnittlich 12 % der hinzugefügten Viren nachgewiesen werden.

Versucht man für die jeweilige Lebensmittelprobe das geeignete Anreicherungsverfahren zu ermitteln, so erweist sich für die Isolierung von Viren aus Fleisch trotz der technischen Schwierigkeiten die Alginatfiltration als die beste; aufgrund des geringsten Virusverlustes bei mittlerer Einengung des Probenvolumens und guter Virusanreicherung (Tab. 11, 12).

Zum Virusnachweis aus Salat bzw. Bier oder Limonade bietet sich das 2-Phasen-System an (Tab. 7 - 10, 21, 22). Technische Probleme bei den Verfahrensweisen bestehen jedoch noch hinsichtlich der Klärung der Suspensionsflüssigkeiten aufgrund der damit verbundenen hohen Virusverluste. Auf eine Klärung kann

jedoch nicht verzichtet werden, da die Belastung der Suspensionen durch Lebensmittelreste die Anwendung der Anreicherungsverfahren zum Virusnachweis vereitelt. Es müssen daher noch weitere Experimente zur Abtrennung von Nahrungsmittelresten aus der Suspensionsflüssigkeit unter Herabsetzung des Virusverlustes durchgeführt werden. Die Frage, inwieweit die hier geprüften Anreicherungsverfahren zur Isolierung anderer Virusarten geeignet ist, muß durch entsprechende Experimente geklärt werden.

8. Zusammenfassung

Vielfach wurden viral bedingte Epidemien beschrieben, bei denen infizierte Lebensmittel als Ursache eine wesentliche Rolle spielten. In jüngster Zeit mehrt sich der Verdacht, daß auch exotische Viren durch Nahrungsmittel aus Ländern der dritten Welt eingeschleppt werden können. Aus diesem Grund fordert die WHO, häufiger Lebensmittel auf Viruskontamination zu untersuchen.

Ziel dieser Arbeit war es daher, verschiedene Verfahren zur Anreicherung von Viren aus Nahrungsmittelproben vergleichsweise zu testen. Erprobt wurden an Fleisch, Salat, Limonade und Bier das 2-Phasen-System, die Alginatfiltration bzw. die FeCl_3 -Flockung kombiniert mit dem 2-Phasen-System. Die Experimente wurden durchgeführt mit Polioviren pII att..

Aufgrund der höchsten Viruswiedergewinnungsraten, der größten Virusanreicherung und einer guten Volumeneinengung der Nahrungsmittelproben erwies sich das 2-Phasen-System unabhängig von der Art des Lebensmittels zur Isolierung der Viren als das geeignetste. Die FeCl_3 -Flockung kombiniert mit dem 2-Phasen-System erbrachte den geringsten Virusrückgewinn, eine nur mäßige Virusanreicherung, jedoch die höchste Volumeneinengung der Nahrungsmittelproben. Die Alginatfiltration war aufgrund der technischen Schwierigkeiten nur bedingt anwendbar, in Fleischproben allerdings wurde mit dieser Methode der höchste Virusgewinn erzielt.

Unabhängig von der Art des Anreicherungssystems traten die höchsten Virusverluste bei der Isolierung der Polioviren aus Salat auf (durchschnittlicher Verlust 88 %.) Die Verluste bei Gulasch bzw. den Getränken lagen bei 69 % bzw. 47 %.

Literatur

1. AISEN, M. S. und E. P. PILLE: An Experimental Study of the Survival of Certain Enteroviruses in Meat Products. Gig. San. 37 (1972) 28 - 30
2. ALBANO, A. und B. FAMIGLIETTI: Gli alimenti come veicolo di agenti virali. Igiene Moderna 61 (1968) 732 - 748
3. ALBERTSSON, P. A.: Two Phase Separation of Viruses in: MARAMOROC, K. und H. KOPROWSKI: Methods in Virology. Acad. Press. New York and London 2 (1967) 303 - 321
4. ANDREWES, C. und H. G. PEREIRA: Viruses of Vertebrates (1967) p. 50 The Williams a. Wilkins Co., Baltimore
5. ATWOOD, R. P., J. C. CHERRY und J. O. KLEIN: Clams and Viruses: Studies with COXSACKIE B5 Virus. Hepatitis Survey Rep. 20 (1964) 26 - 30
6. AYCOCK, W. L.: A Milk-Borne Epidemic of Poliomyelitis. Amer. J. Hyg. 7 (1927) 791 - 803
7. BARBER, G.: Acute Anterior Poliomyelitis: Four Simultaneous Cases in a School. Brit. Med. J. 2 (1938) 1137 - 1139

8. BELLELLI, E. und G. LEOGRANDE: Ricerche batteriologiche et virologiche sui mitili. Ann. Sclavo 9 (1967) 820 - 828
9. BENDINELLI, M. und A. RUSCHI: Isolation of Human Enteroviruses from Mussels. Appl. Microbiol. 18, (1969) 531 - 532
10. BERG, G.: The Food Vehicle in Virus Transmission. Health. Lab. Science 1 (1964) 51 - 59
11. BERG, G.: Transmission of Viruses by the Water Route. Interscience Publ., John Wiley and Sons, New York (1967), p. 369
12. BONDARENKO, V. J. und L. V. GRIGORYEVA: Isolation of Enteroviruses from the Surface of Vegetables and Fruit. Microbiol. Zh, 37, (1975), 244 - 247
13. CANDEIAS, J. A. N., D. de A. CHRISTOVAS und L. G. COTILLO Z. ISOLAMENTO DE VIRUS DE COPOS DE BARES E CAFÉS DA CIDADE DE SAO PAULO. SEPARATA DA REVISTA DE SAÚDE PÚBLICA 2 (1963) 174 - 179
14. CHRISTENSSON, I.: Om ostron-gulsoten från Buhuslän. Medlemsblad för Sveriges Veterinärförbund, 6 (1959) 1 - 7

15. CLIVER, D. O. und J. Yeatman: Ultracentrifugation in the Concentration and Detection of Enteroviruses. Appl. Microbiol. 13, (1965) 387 - 392
16. COUCH, J. A., M. D. SUMMERS und L. COURTNEY: Environmental Significance of Baculovirus Infections in Extuarine and Marine Shrimps. In "Pathobiology of Invertebrate Vectors of Disease." ANN. New York ACAD. SCI. 266 (1975) 528 - 536
17. CROVARI, P.: Sulla depurazione dei mitili nei confronti del virus poliomielitico. Igiene Moderna 51, (1958) 22 - 32
18. DI GIROLAMO, R., J. LISTON und J. R. MATCHES: Survival of Virus in Chilled, Frozen and Processed Oysters. Appl. Microbiol. 20, (1970) 58 - 63
19. DI GIROLAMO, R., L. WICZYNSKI, M. DALEY und F. MIRANDA: Preliminary Observations on the Uptake of Poliovirus by West Coast Shore Crabs. Appl. Microbiol. 23 (1971) 170 - 171
20. DI GIROLAMO, R., L. WICZYNSKI, M. DALEY, F. MIRANDA und C. VIEHWEGGER: Uptake of Bacteriophage and Their Subsequent Survival in Edible West Coast Crabs after Processing. Appl. Microbiol. 23, (1972) 1073 - 1076

21. DIMMOCK, I. F.: Differences between the Thermal Inactivation of Picorna Viruses at "High" and "Low" Temperatures. *Virology* 31 (1967) 338 - 342
22. DINGMANN, J. C.: Report of a Possibly Milk-Borne Epidemic of Infantile Paralysis, New York State J. Med. 16, (1915) 589 - 590
23. DISMUKES, W. E., A. L. BISNO, S. KATZ und R. F. JOHNSON: An Outbreak of Gastroenteritis and Infectious Hepatitis Attributed to Raw Clams. *Amer. J. of Epidemiol.* 89, (1969) 555 - 561
24. DOUGHTERY, W. J. und R. ALTMANN: Viral Hepatitis in New Jersey. *Amer. J. Med.* 32, (1962) 704 - 716
25. EISENSTEIN, A. B., R. D. AACH, W. JACOBSON und A. GOLDMAN: An Epidemic of Infectious Hepatitis in a General Hospital.-Probable Transmission by Contaminated Orange Juice - *J. Amer. Med. Ass.* 185 (1963) 171 - 174
26. FUGATE, K. J., D. O. CLIVER und M. T. HATCH: J. Milk Technol. 38, (1975) 100 - 104
27. GARIBALDI, R. A., G. D. MURPHY und B. T. WOOD: Infectious Hepatitis Outbreak Associated with Cafe Water. *H. S. M. H. A. Health Rep.* 87, (1972) 164 - 171

28. GOLDSTEIN, D. M., M. D. HAMMON und H. R. VIETS:
An Outbreak of Polioencephalitis Among
Navy Cadets, Possibly Food Borne. J. Amer.
Med. Ass. 131, (1946) 569 - 573
29. GRABOW, W. O. K.: Progress in Studies on the Typ A
(Infectious) Hepatitis Virus in Water.
WATER SA, 2, (1976) 20 - 24
30. GRINDROD, J. und D. O. CLIVER: A Polymer Two-Phase System
for Detection of Viruses. Archiv für die
gesamte Virusforschung 31, (1970) 365 - 372
31. HAMBLET, F. E., W. F. HILL, E. W. AKIN und W. H. BENTON:
Oyster and Human Viruses. Effect of Sea-
water Turbidity on Poliovirus Uptake and
Elimination. Amer. J. Epidem. 89, (1968)
562 - 571
32. HAVENS, W. P.: Viral Hepatitis, Clinical Patterns and
Diagnosis. Amer. J. Med. 32, (1962) 665 - 678
33. HEDSTRÖM, C.-E. und E. LYCKE: An Experimental Study on
Oyster as Virus Carriers. Amer. J. of
Hyg. 79, (1964) 134 - 142
34. HEIDELBAUGH, N. D. und D. J. GIRON: Effect of Processing on
Recovery of Poliovirus from Inoculated
Foods. J. Food Sci. 34, (1969) 234 - 237

35. HEPATITIS SURVEILLANCE REPORT: Communicable Disease Center,
Atlanta, Public Health Service, 10,
(1962) 1 - 12
36. HERNANDEZ, JR., R. H., J. H. GREENBERG, R. E. OLSON:
An Outbreak of Infectious Hepatitis
Probably Due to Contamination of Food.
Amer. J. Epidem. 84, (1966) 247 - 252
37. HERRMANN, J. E. und D. O. CLIVER: Food-Borne Virus:
Detection in a Model System. Appl.
Microbiol. 16, (1968) 595 - 602
38. HERRMANN, J. E. und D. O. CLIVER: Methods for Detecting
Food-Borne Enteroviruses. Appl.
Microbiol. 16, (1968) 1564 - 1569
39. HOCH, R. und L. ORNAY: Fortpflanzung der Virusinfektionen
durch Lebensmittel. (Ungarisch)
Konzerv-es Paprikaipar 5, (1973)
171 - 173
40. HOFF, J. C. und R. C. BECKER: The Accumulation and Elimination
of Crude and Clarified Poliovirus
Suspensions by Shellfish. Amer. J.
Epidemiol. 90, (1969) 53 - 58
41. JOHNSON, P. T.: A Herpeslike Virus from the Blue Crab,
Callinectes sapidus. J. Invert. Pathol.
27, (1976) 419 - 420
42. JUBB, G.: A Third Outbreak of Epidemic Poliomyelitis
at West Kirby. Lancet 1, (1915) 67

43. KIRK, R.: Spread of Infectious Hepatitis.
Lancet 1, (1945) 80
44. KJELLANDER, J.: Hygienic and Microbiol Viewpoints on
Oysters as Vectors of Infection. Sv.
Lakartidn. 53, (1956) 1009 - 1018
45. KNAPP, A. C., E. S. GODFREY und W. L. AYCOCK: An Outbreak
of Poliomyelitis Apparently Milk-Borne,
J. A. M. A. 87, (1926) 635 - 539
46. KOFF, R. S., G. F. GRADY, T. C. CHALMERS, J. W. MOSLEY,
B. L. SWARTZ and the Boston Inter-
Hospital Liver Group.
Viral Hepatitis in a Group of Boston
Hospitals. III. Importance of Exposure
to Shellfish in a Nonepidemic Period.
New Engl. J. Med. 267, (1967) 703 - 710
47. KONOWALCHUK, J. und J. I. SPEIRS: Enterovirus Recovery from
Laboratory Contaminated Samples of
Shellfish. Can. J. Microbiol. 18, (1972)
1023 - 1029
48. KONOWALCHUK, J., J. I. SPEIRS, R. D. PONTEFRANKT und
G. BERGERON: Concentration of Enteric
Viruses from Water with Lettuce Extract.
Appl. Microbiol. 28, (1974) 717 - 719
49. KOSTENBADER, JR., K. D. und D. O. CLIVER: Polyelectrolyte
Flocculation as an Aid to Recovery of
Enteroviruses from Oysters. Appl.
Microbiol. 24, (1972) 540 - 543

50. KOSTENBADER, JR., K. D. und D. O. CLIVER: Filtration Method for Recovering Enteroviruses from Foods. Appl. Microbiol. 26, (1973) 149 - 154
51. KRUGMAN, S.: Infectious Hepatitis: Studies on Effect of Gamma Globulin and on Incidence of Inapparent Infection. J. A. M. A. 174, (1960) 823 - 831
52. LARKIN, E. P. und R. M. DUTCHER: Recovery of Rauscher Leukemia Virus from Large Volumes of Seeded Cow's Milk and from Infected Murine Spleens. Appl. Microbiol. 20 (1970) 64 - 68
53. LARKIN, E. P., J. T. TIERNEY und R. SULLIVAN: Persistence of Poliovirus I in Soil and on Vegetables Irrigated with Sewage Wastes: Potential Problems. In "Virus Aspects of Applying Municipal Waste to Land", Symposium Proceedings, edited by BALDWIN, L. B., J. M. DAVIDSON and J. F. GERBER. Center for Environmental Programms University of Florida, Gainesville (1976) 119 - 130
54. LEMON, H. M.: Food-Borne Viruses and Malignant Hemopoietic Diseases. Bacteriological Reviews 28, Nr. 4 (1964) 490 - 492
55. LÉPINE, P., J. BOYER und H. SAPIN-JALOUSTRE: Poliomyélite et eau d'alimentation. La Presse Médicale 60, (1952) 1057 - 1058

56. LINDBERG, B. und A. M. BRAMAN: Clinical Observations on the So-Called Oyster Hepatitis. Amer. J. Public Health Nat. Health 53, (1956) 1003 - 1011
57. LIPARI, M.: A Milk-Borne Poliomyelitis Episode. New York State J. Med. 51, (1951) 362 - 369
58. LIU, O. C., H. R. SERAICHEKAS und B. L. MURPHY: Fate of Poliovirus in Northern Quahaugs. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 121, (1966) 601 - 606
59. LIU, O. C., H. R. SERAICHEKAS und B. L. MURPHY: Viral Depuration of the Northern Quahaugh. Appl. Microbiol. 15, (1967) 307 - 315
60. LUND, E. und C. E. HEDSTRÖM: The Use of an Aqueous Phase System for Enteroviruses Isolations from Sewage. Amer. J. Epidemiol. 84, (1966) 287 - 291
61. LUND, E. und C. E. HEDSTRÖM: The Use of an Aqueous Polymer Phase System for Enterovirus Isolations from Sewage. Amer. J. Epidemiol. 84 (1966) 287 - 291
62. LYNT, JR., R. K.: Survival and Recovery of Enteroviruses from Foods. Appl. Microbiol. 14, (1966) 218 - 222

63. MASON, J. O. und W. R. McLEAN: Infectious Hepatitis Traced to the Consumption of Raw Oysters: An Epidemiologic Study. Amer. J. Hyg. 75, (1962) 90 - 111
64. MAYR, A.: Referat "Tatsachen und Spekulationen über Viren in Lebensmitteln tierischen Ursprungs" Düsseldorfer Hygienetage, April 1977
65. MAZUR, B. und W. PACIORKIEWICZ: Dissemination of Enteroviruses in the Human Environment. I. The Presence of Poliovirus in Various Parts of Vegetable Plants Grown on Infected Soil. Med. Dosw. Mikrobiol. 25, (1973) 93 - 98
66. MAZUR, B. und W. PACIORKIEWICZ: Dissemination of Enteroviruses in the Human Environment. II. Occurrence and Survival of Poliovirus in Overground Parts of Vegetable Plants Grown on Infected Soil. Med. Dosw. Mikrobiol. 25, (1973) 177 - 185
67. METCALF, T. G. und W. C. STILES: "Survival of Enteric Viruses in Estuary Waters and Shellfish" in: Transmission of Viruses by the Water Route, edited by BERG, G., New York, Interscience Publishers, Inc. (1967) 439 - 447
68. METCALF, T. G. und W. C. STILES: The Accumulation of Enteric Viruses by the Oyster, *Crassostrea Virginica*. J. Inf. Dis. 115, (1965) 68 - 76

69. MILO, JR., G. E.: Thermal Inactivation of Poliovirus in the Presence of Selective Organic Molecules (Cholesterol, Lecithin, Collagen and Carotene)
Appl. Microbiol. 21, (1971) 198 - 202
70. MITCHELL, J. R., M. W. PRESNELL, E. W. AKIN, J. M. CUMMINS und O. C. LIU: Accumulation and Elimination Of Poliovirus by the Eastern Oyster. Amer. J. Epidemiol. 84, (1966) 40 - 50
71. MOSLEY, J. W.: Clam Associated Epidemic Infectious Hepatitis. Hepatitis Surveillance Rep. 18, (1964) pp. 14
72. MOSLEY, J. W.: Shellfish Associated Infectious Hepatitis. Hepatitis Surveillance Rep. 19 (1964) 30 - 36
73. MOSLEY, J. W.: Transmission of Viral Diseases by Drinking Water. in: Transmission of Viruses by the Water Route, edited by BERG, G., New York Interscience Publishers, Inc. (1967) 5 - 23
74. MOSLEY, J. W.: Viral Hepatitis: A Group of Epidemiologic Entities. Can. Med. Assoc. J. 106, (1972) 427 - 434
75. MURPHY, W. J., L. M. PETRIE und S. D. WORK: Outbreak of Infectious Hepatitis--Apparently Milk-Born. Amer. J. Publ. Hlth. 36, (1946) 169 - 173

76. NATIONAL COMMUNICABLE DISEASE CENTER: Hepatitis Surveillance Report 19, (1964) 30 - 32
77. NUPEN, E. M.: Personal Communication. National Institute for Water Research, P. O. Box 395 Pretoria, South Africa, in: Proceedings Thirteenth Water Quality Conference February 1971, Virus and Water Quality: Occurrence and Control, ed, by SNOEYINK, V. L. (1970)
78. NUPEN, E. M.: Virus Studies on the Windhoek Waste-Water Reclamation Plant. (South Africa). Water Research, Pergamon Press 4, (1970)
79. PLOTKIN, S. A. und M. KATZ: "Minimal Infective Doses of Viruses for Man by the Oral Route" in: BERG, G. ed. Transmission of Viruses by the Water Route. New York. WILEY & SONS, (1965) 151 - 166
80. PRIMAVESI, C. A. und J. WOSTENBERG: Ergebnisse virologischer Abwasseruntersuchungen. Arch. Hyg. 150, (1966) 196 - 207
81. REED, J. L. und H. MUENCH: A Simple Method for Estimating Fifty Percent Endpoints. Amer. J. Hyg. 27, (1938) 493
82. RINDGE, S. J., R. F. JOHNSON, J. W. MOSLEY, J. B. ATWATER, M. A. ROSETTI und J. C. HART: An Epidemic of Clam Associated Hepatitis. J. Amer. Med. Assoc. 208, (1964) 649 - 655

83. ROOS, B.: Hepatitis Epidemic Conveyed by Oysters.
Svensk Lakatidn 53, (1956) 989 - 1003
84. SCHÄFER, E.: Austern und Muscheln als Virusvektoren.
Umweltmedizin 1, Jahrgang 1, (1973) 21 - 23
85. SCHÄFER, E.: Experimentelle Untersuchungen zur quanti-
tativen Erfassung von Polio-Impfvirus Typ II
in Oberflächenwasser. gwf-wasser/abwasser
112, (1971) 109 - 113
86. SHAUN, J., M. D. RUDDY, R. F. JOHNSON, J. W. MOSLEY, J. B. ALT-
WATER, M. A. ROSSETTI und J. C. HART:
An Epidemic of Clam-Associated Hepatitis.
J. A. M. A. 208, (1969) 649 - 655
87. SHUVAL, H. J., S. CYMBALISTA, B. FATTAL und N. GOLDBLUM:
Concentration of Enteric Viruses in Water
by Hydro-Extraction and Two-Phase Separation
in: Transmission of Virus by the Water
Route ed. by BERG, G., Interscience Publishers
New York (1967)
88. SOBSEY, M. D., C. WALLIS und J. L. MELNICK: Development of a
Simple Method for Concentrating Entero-
viruses from Oysters. Appl. Microbiol. 29,
(1975) 21 - 26
89. SULLIVAN, R., A. C. FASSOLITIS und R. B. READ JR.:
Method for Isolating Virus from Ground Beef
Journal of Food Science 35, (1970) 624 - 626

90. TIERNEY, J. T., R. SULLIVAN, E. P. LARKIN und J. T. PEELER:
Comparison of Methods for the Recovery of
Virus Inoculated into Ground Beef. Appl.
Microbiol. 26, (1973) 497 - 501
91. TOOMEY, J. und M. AUGUST: Poliomyelitis: Comparison between
Epidemic Peack and Harvest Peack. Amer. J.
Dis. Chil. 46, (1933) 262 - 279
92. VAN ROOYEN, C. E. und G. H. KIRK: Spread of Infective Hepatitis
and Poliomyelitis in Egipt. Edimburgh,
Med. J. 53, (1946) 529 - 643
93. VISWANATHAN, R.: Certain Epidemiological Features of Infectious
Hepatitis during Dehli Epidemic 1955 - 1956
in: Hepatitis Frontiers, ed. by. HARTMANN, F. W.,
L. GRIPOTT, J. G. MATEER et al.: Boston, Little,
Brown and Company, (1957) 207 - 210
94. WALLIS, C. und J. L. MELNICK: Thermostabilization and Thermo-
sensitization of Herpesvirus. J. Bacteriol.
90, (1965) 1632 - 1637
95. WALLIS, C., C. YOUNG und J. L. MELNICK: Effects of Cations on
Thermal Inactivation of Vaccinia, Herpes
Simplex and Adenovirus. J. Immunol. 84, (1962)
41 - 47
96. WARD, R., J. L. MELNICK und D. M. HORSTMANN: Poliomyelitis
Virus in Fly Contaminated Food Collected at an
Epidemic. Science 101 (1945) 491 - 493

97. WESTWOOD, J. C. N. und S. A. SATTAR: The Minimal Infective Dose. in: "Viruses in Water", ed. by G. BERG, H. L. Bodily, E. H. LENNETTE, J. L. MELNICK und T. G. METCALF.
Amer. Pub. Hlth. Assoc. (1976) 61 - 69
98. WHO: Food-Borne Disease. Methods of Sampling and Examination in Surveillance Programmes. Report of a WHO Study Group. World Health Organization Technical Report Series. 543, (1974)

Lebenslauf

Am 8. September 1948 wurde ich in Andernach als zweites Kind des Facharztes für Innere Medizin Dr. med. Josef Wagner und seiner Ehefrau Dr. med. Ruth geb. Grünewald geboren.

Von 1954 bis 1959 besuchte ich die Volksschule in Burgbrohl, von 1959 bis 1968 das Kurfürst-Salentin-Gymnasium in Andernach, wo ich am 18. Juni 1968 das Abitur ablegte.

Nach Ableistung meines 18monatigen Wehrdienstes immatrikulierte ich mich zum Sommersemester 1970 an der Medizinischen Fakultät der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, vor deren Prüfungsausschuß ich am 9. Juli 1976 die Ärztliche Prüfung bestand.

Die anschließende Medizinalassistentenzeit verbrachte ich im Hygiene Institut der Universitätsklinik Mainz, in der Chirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Grünstadt und in der Internen Abteilung des Stifthospitals Andernach, wo ich zur Zeit als Assistenzarzt tätig bin, nachdem mir am 3. November 1977 vom Präsidenten des Landesamtes für Jugend und Soziales Rheinland-Pfalz die Approbation als Arzt erteilt wurde.

Am 25. April 1975 heiratete ich die MTA Fräulein Traudel Bingemann, am 22. Juli 1976 wurde unser Sohn Christian Jochen und am 11. Juli 1978 unser Sohn Sebastian Peter geboren.

Für die freundliche Bereitstellung
des Dissertationsthemas und die fach-
liche Hilfe möchte ich mich bei
Herrn Professor Dr. E. Pfeiffer
bedanken.

Fräulein Susanne Aderhold danke ich
für ihre technische Unterstützung.

Druck: Reinartz

Copier- und Offset-Center

Gaustraße 16, Telefon 061 31/9 38 70 + Kirschgarten 3, Telefon 061 31/9 62 02
6500 Mainz

